Wachstum und Stoffwechsel von *Rhodopseudomonas spheroides* in Abhängigkeit von der Versorgung mit Mangan und Eisen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Wolfgang Wießner
aus Stettin

Göttingen 1959

D 7

Referent: Prof. Dr. A. Pirson

Korreferent: Prof. Dr. H. G. Schlegel

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 11. 1959

Abdruck aus der
Flora oder allgemeinen botanischen Zeitung. Bd. 149. 1960
Herausgegeben von
H. Drawert, Marburg/Lahn, F. Firbas, Göttingen, K. Mothes, Halle/Saale,
und A. Pirson, Göttingen

VEB GUSTAV FISCHER VERLAG · JENA

Satz und Druck: Druckerei „Magnus Poser", Jena
Printed in Germany
ZLN 5092

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen)

Wachstum und Stoffwechsel von *Rhodopseudomonas spheroides* in Abhängigkeit von der Versorgung mit Mangan und Eisen

Von

Wolfgang Wießner

Mit 26 Abbildungen im Text

(Eingegangen am 20. Dezember 1959)

I. Einleitung

Die Analyse komplexer stoffwechselphysiologischer Vorgänge hat sich schon oft mit Erfolg der vergleichenden biochemischen Untersuchung verschiedener Organismen und Organismentypen bedient. Ein besonders bekanntes Beispiel bieten in dieser Beziehung die Untersuchungen, die den Vergleich der Photosynthese bei Grünalgen und Photobakterien herangezogen haben. Seit den ersten Untersuchungen von VAN NIEL sind auf diesem Wege wesentliche Anregungen und Erkenntnisse bezüglich des Photosynthesevorganges im allgemeinen gewonnen worden (VAN NIEL 1941, ARNON 1959).

Da über die Beeinflussung der Photosynthese und der aeroben Atmung durch Faktoren der Mineralsalzernährung für Grünalgen bereits einige Erfahrungen vorliegen (PIRSON 1937, PIRSON und Mitarbeiter 1952, BERGMANN 1955, KESSLER 1955, 1957, REISNER und THOMPSON 1956, EYSTER und Mitarbeiter 1956, 1958), lag es nahe, unter dem Gesichtspunkt der vergleichenden biochemischen Betrachtung entsprechende Untersuchungen auch an Purpurbakterien anzustellen.

Dieser Weg schien deshalb besonders lohnend, weil bei den Grünalgen vom *Chlorella*-Typ schon bemerkenswerte Aufschlüsse durch Vergleich der Normalphotosynthese und der anaeroben Photosynthese (Photoreduktion) erhalten worden sind (KESSLER 1955, 1957); dieser anaerobe Photosynthesetyp hat in mancher Hinsicht Ähnlichkeit mit der Photosynthese der Purpurbakterien.

Da es auf dem genannten Weg u. a. möglich war, die Rolle des Spurenelementes Mangan innerhalb der Algenphotosynthese in einleuchtender

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Weise zu lokalisieren, und zwar in dem Teilmechanismus, der zur photosynthetischen Sauerstoffentwicklung führt, schien es erfolgversprechend, die vergleichende Untersuchung zwischen Purpurbakterien und Grünalgen gerade mit diesem Spurenelement zu beginnen.

In der Literatur wird vielfach eine grundsätzlich ähnliche Wirkung von Mangan und Eisen im Stoffwechsel erörtert (u. a. LÖHNIS 1951, GERRETSEN 1949, HEWITT 1953), anderseits scheint das Mangan aber bei der Photosynthese eine durchaus eigenständige Rolle zu spielen. Deshalb wurden unsere Untersuchungen auch auf die Frage der Eisenwirkung ausgedehnt. Die Versuchstechnik wurde in den Grundzügen von den früheren Arbeiten an Algen übernommen. Es wurden zunächst bei möglichst abgestufter Dosierung die Kennzeichen des Mineralsalzmangels in Wachstum und Stoffwechsel erfaßt und in der Folge die Reaktionen der Zellen auf die Wiederzufuhr des begrenzenden mineralischen Faktors verfolgt.

Als Versuchsobjekt diente in der vorliegenden Untersuchung *Rhodopseudomonas spheroides*, eine photoheterotrophe Athiorhodacee, die bei Anaerobiose im Licht organische Wasserstoffdonatoren verarbeitet, anderseits aber diese Wasserstoffdonatoren auch im Dunkeln in einen aeroben Abbau einbeziehen kann. Das Objekt bietet somit die Gelegenheit, den anaeroben Lichtstoffwechsel und den aeroben Dunkelstoffwechsel in ihrer Beziehung zur Mineralsalzversorgung zu vergleichen, eine Möglichkeit, die auch gewisse Aspekte für die Untersuchung des Bakterienstoffwechsels selbst eröffnet.

Da in der Literatur beschriebene Anzuchtbedingungen für *Rhodopseudomonas spheroides* bei unserer Fragestellung nicht befriedigen konnten, war zunächst eine verhältnismäßig umfangreiche Untersuchung über die Bedingungen des Wachstums dieser Photobakterien unter optimalen Ernährungsbedingungen und über die Möglichkeit der Stoffwechselmessung erforderlich.

II. Methodik

A. Versuchsobjekte und ihre Anzucht

Für vorliegende Arbeit wurden *Rhodopseudomonas spheroides* VAN NIEL (Sammlung ELSDEN/Sheffield) und *Chlorella vulgaris* BEJ. (Sammlung PRINGSHEIM/Göttingen, 211/11h) verwendet.

1. Kultur von *Rhodopseudomonas spheroides*

Normal-Nährlösung. Die Bakterien wurden in einer vollsynthetischen Nährlösung angezogen, zu deren Herstellung ausschließlich „pro analysi"-Chemikalien der Firma Merck benutzt wurden. Das Nährmedium hatte folgende Zusammensetzung:

1000 ml Wasser (quarzdestilliert); 3,8 g Glutaminsäure; 2,8 g Äpfelsäure; 0,5 g KH_2PO_4 (nach Sörensen); 0,5 g K_2HPO_4; 0,8 g $(NH_4)_2HPO_4$; 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$; 0,2 g Titriplex III (Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure)[1]); 0,05 g $CaCl_2 \cdot$ aqu.; 0,005 g $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$.

In jedem Liter dieser Nährlösung war außerdem 1 ml folgender Spurenelementlösung enthalten: 100 ml H_2O; 840 mg H_3BO_3; 120 mg $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$; 60 mg $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$; 90 mg $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$; 210 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$; 360 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$; ferner 1 mg Aneurin; 1 mg Nicotinsäure und 0,01 mg Biotin.

Der pH-Wert der Nährlösung wurde mit Natronlauge auf 6,9 eingestellt.

Für einige Versuche wurde im Kulturmedium die Äpfelsäure durch Brenztraubensäure (2,75 g/L) oder durch Essigsäure (3,0 g/L) ersetzt. Das Wasser für die Nährlösung wurde im ersten Schritt in einer verzinnten Destillationsanlage, im zweiten über Quarz destilliert und in Polyäthylenballons oder Jenaer Glasflaschen aufgefangen.

Das Kulturmedium wurde bei 1 atm 10 Minuten lang autoklaviert.

Mineralsalzmangel-Nährlösung. In Eisen- und Manganmangellösungen wurden die betreffenden Mineralsalze fortgelassen.

Stammkulturen. Die Stammkulturen wurden als Agar-Stichkulturen in einem Medium aus 0,3% DIFCO-Hefeextrakt mit dem Zusatz von 1,5% Agar (Merck, für bakteriologische Zwecke) angezogen. Die Bakterien konnten in den Stammkulturen auf rein synthetischem Medium nicht gehalten werden, da nach mehreren Passagen die Fähigkeit zur anaeroben und aeroben Verarbeitung einiger organischer Säuren verlorenging. Die Kulturen wurden 3—5 Tage im Lichtthermostaten angezogen und anschließend bei 4° C aufbewahrt. Ein Überimpfen war in der Regel alle 2—3 Monate notwendig.

Impfmaterial. Das Impfmaterial für Versuchskulturen wurde in 50 ml-Flaschen im Lichtthermostaten bei 30° C kultiviert. 24 Stunden altes Material diente zum Beimpfen der Versuchsröhren.

Für Manganmangelversuche wurde schon das Impfmaterial bei Manganmangel angezogen. Die Fähigkeit zur Verarbeitung anderer organischer Säuren als Äpfelsäure blieb nur erhalten, wenn die Nährlösung zur Anzucht des Impfmaterials einen Zusatz von 1 g Natriumazetat/Liter erhielt.

Anzucht des Versuchsmaterials. Die Bakterien für Versuchszwecke wurden in einer Kulturanlage mit kontinuierlichem Gasumlauf angezogen. Durch Verwendung von Spezialgefäßen konnte die Kultur völlig steril auch bei mehrfacher Probenentnahme vorgenommen werden.

Als Kulturgefäß (Abb. 1) dienten 45 cm hohe Röhren (Durchmesser 4 cm) mit einer Gaszuleitung am unteren Ende. Die Gefäße sind durch Schliffkappen verschließbar, die einen Glasstutzen zur Ableitung des die Gefäße durchströmenden Gases besitzen. Drei cm vom Boden entfernt befindet sich an den Röhren ein Auslaufhahn und darüber ein kurzer, mittels Gummikappe verschließbarer Stutzen. Durch den Hahn können den Röhren steril Nährlösungen aus einer Vorratsflasche zugeführt oder größere Proben entnommen werden, ohne daß eine Verunreinigung der Kulturen erfolgt.

1) Wie in der angelsächsischen Literatur im folgenden mit „EDTA" abgekürzt.

Mit Hilfe einer Injektionsspritze wurden durch die Gummikappe Lösungen der Kultur zugegeben oder beimpft. Ebenso ist die Entnahme kleiner Proben möglich. Schliffe und Hähne waren leicht mit Exsiccatorenfett geschmiert.

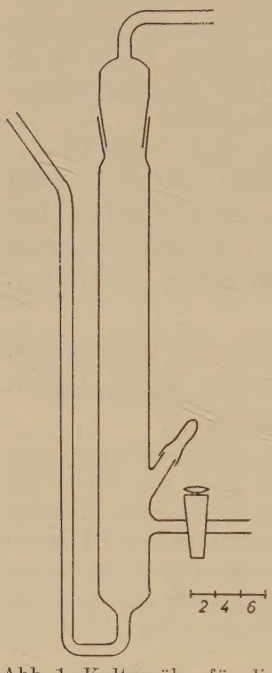


Abb. 1. Kulturröhre für die Anzucht von *Rhodopseudomonas spheroides*.

Die Kulturanlage besteht aus einem Lichtthermostaten und einer zur Erzielung eines gleichmäßigen, sauerstofffreien Gasstromes erforderlichen Einrichtung.

Im Lichtthermostaten ist zur Konstanthaltung der Temperatur eine über Kontaktthermometer und Relais gesteuerte elektrische Heizung eingebaut. Gegenkühlung erfolgt durch zwei an der Decke angebrachte starke Ventilatoren, die ebenfalls über Kontaktthermometer geschaltet werden. Die Temperaturschwankung bei einer normalen Anzuchttemperatur von 30° C betrug $\pm$ 0,3° C.

Die Kulturgefäße, die im Innern der Anlage an einem Metallständer eingehängt werden können, werden durch an der Rückwand des Thermostaten angebrachte Glühlampen (40 und 60 Watt) beleuchtet. Die Anzucht der Bakterien erfolgt bei 2000 Lux. Für die anaerobe Begasung diente folgendes System (Abb. 2):

Präzisionsdruckminderer (Saturn-Saturn-Regulus der Firma Draeger/Lübeck) halten die zur Begasung der Kulturen dienenden Gase bei konstantem Niederdruck. Die Gase passieren Kapillarströmungsmesser, deren Durchmesser im Verhältnis der zu mischenden Gase geeicht sind, und treten in ein Mischgefäß ein. Sodann durchströmt das Gemisch ein Platin-Asbestrohr, in dem durch dem Gasstrom zugesetzten Wasserstoff letzte Sauerstoffspuren katalytisch entfernt werden und gelangt dann in die Kulturgefäße. Aus diesen austretend wird das Gas wieder gesammelt und einer Pumpe zugeführt, die es in das Mischgefäß zurückdrückt.

Auf diese Weise entsteht ein geschlossener Gaskreislauf, der nur durch die in den Kreislauf eingebaute Pumpe in Bewegung gehalten wird. Ist der Niederdruck der aus den Vorratsflaschen fließenden Gase so einreguliert, daß er dem Druck entspricht, mit dem das Gasgemisch durch die Pumpe in das Mischgefäß zurückgeführt wird, so kann aus den Vorratsflaschen kein Gas entströmen, und im Kreislauf fließt stets das gleiche Gemisch. Verbrauchen die Organismen Gas, so sinkt der Druck, mit dem die Gase in das Mischgefäß zurückkehren, und aus den Vorratsflaschen kann Gas nachfließen. Wird nur die Zuleitung für das verbrauchte Gas geöffnet, dann bleiben im System Druck- und Mischungsverhältnisse konstant.

Tritt durch die Probenentnahme aus den Kulturen eine Vergrößerung des Gasvolumens in den Kulturgefäßen ein, so führt dies gleichfalls zu einer Abnahme des Druckes im Kreislauf, und die Auffüllung erfolgt bis zum Druckausgleich im Mischungsverhältnis der Gase.

Dieses geschlossene Begasungssystem kann außerdem durch Kohlendioxydzufuhr die Wasserstoffionenkonzentration annähernd konstant halten. Werden die Kulturen

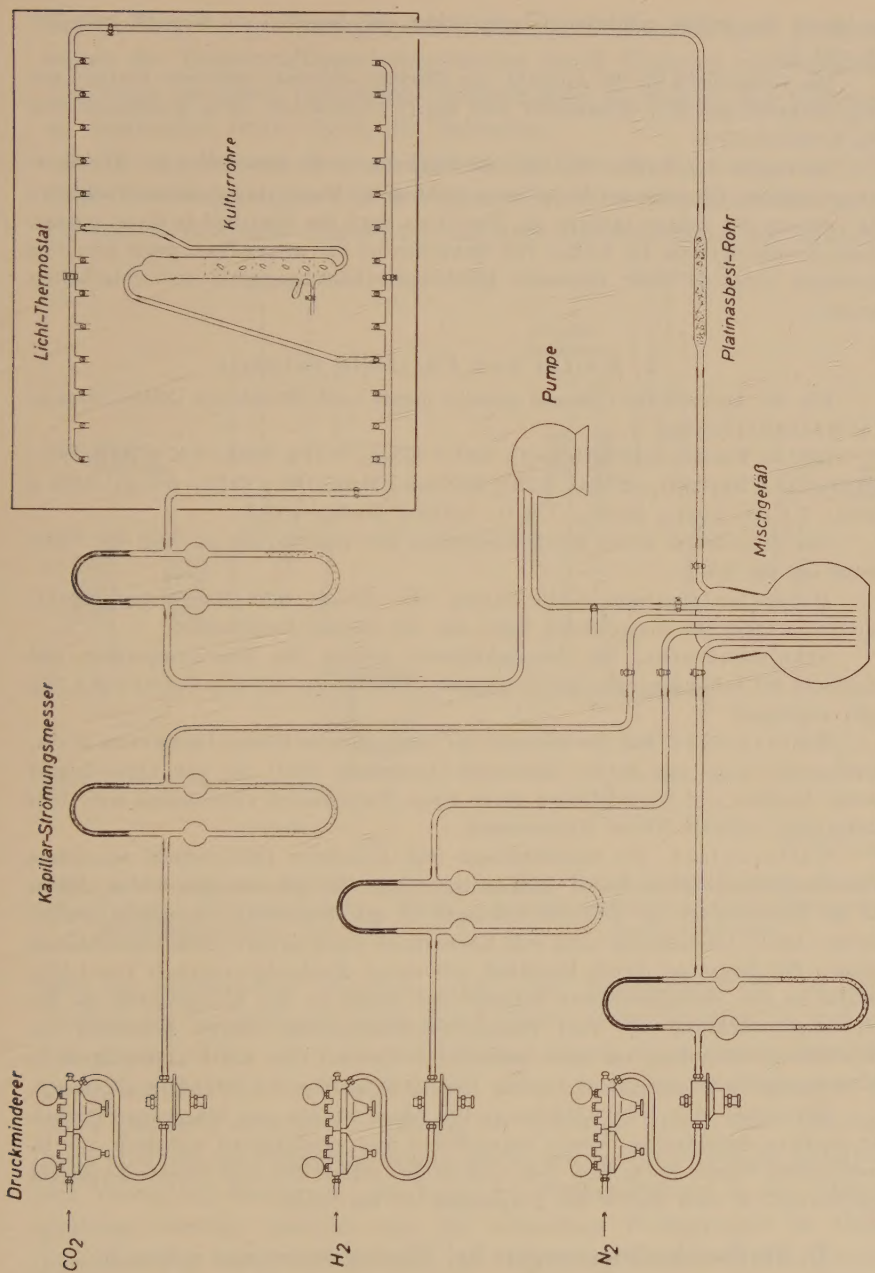


Abb. 2. Schematische Darstellung der Kulturanlage für die anaerobe Anzucht von *Rhodopseudomonas spheroides*. (Die Darstellung ist nicht maßstabgerecht.)

durch Verbrauch des Wasserstoffdonators alkalisch, so bindet im Gasstrom vorhandenes CO_2 die Alkaliionen als Karbonat bzw. Bikarbonat. Dieser Karbonat/Bikarbonat-Puffer und das Kohlendioxyd im Gasraum halten bei geeigneter Menge

des durch die Gefäße geführten Gasgemisches den pH-Wert im Bereich zwischen 7,2 und 7,5.

Das Gasgemisch für die Anzucht von *Rhodopseudomonas spheroides* bestand aus 80% Stickstoff und 20% Wasserstoff oder aus 75% Stickstoff, 20% Wasserstoff und 5% Kohlendioxyd.

Bei Beginn der Kultur wird ein Dreiwegehahn an der Druckseite der Kreislaufpumpe geöffnet. Die Gase werden so lange nicht in das Mischgefäß zurückgedrückt, bis alle Luft aus der Anlage entfernt ist. Erst dann wird der Kreislauf in Gang gesetzt. Dieses Kreislaufsystem zur Kultur von Bakterien ist nur anwendbar, wenn kein Gas entwickelt wird, da sonst konstante Mischungsverhältnisse nicht aufrechterhalten werden.

2. Kultur von *Chlorella vulgaris*

Für die Anzucht von *Chlorella vulgaris* diente nach BERGMANN (1955) folgende Normalnährlösung.

1000 ml Wasser (quarzdestilliert); 0,81 g KNO_3; 0,47 g NaCl; 0,47 g $NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$; 0,18 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$; 0,25 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$; 0,02 g $CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$; 0,001 g $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$; 0,001 g $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$; 0,0002 g $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$.

Alle Mineralsalze waren Merck-Reagenzien zur Analyse. Der pH-Wert der Nährlösung lag bei 6,3.

Mineralsalzmangel-Nährlösung. In Eisen- und Manganmangelnährlösungen wurden die betreffenden Salze aus der Lösung fortgelassen.

Stammkulturen. Die Stammkulturen wurden bei Raumtemperatur und Tageslicht auf Schrägagarröhrchen in normaler Nährlösung mit dem Zusatz von 1,5% Agar angezogen.

Kulturgefäße. Für die Anzucht der Algen dienten Röhren (Höhe etwa 45 cm, Durchmesser 4 cm) aus Jenaer Geräteglas (LORENZEN 1957), die von unten begast werden konnten und deren Öffnung durch einen Wattebausch verschlossen war. Jede Kulturröhre enthielt 300 ml Kulturlösung.

Kulturanlage. Die Anzuchtanlage (vgl. LORENZEN 1959) besteht aus einem Wasserbadthermostaten, dessen Längsseiten große Plexiglasscheiben bilden, hinter die die Kulturröhren an Haltevorrichtungen in das Wasserbad eingehängt werden können. An die Gaszuleitung kann jede Röhre durch einen eigenen Hahn angeschlossen werden. Zur Begasung diente Druckluft mit einem Kohlendioxydgehalt von 1,5%. Parallel zu den Plexiglasfenstern befindet sich außen an den Kulturkästen die Beleuchtungsvorrichtung mit fünf Philips-Leuchtstoffröhren. Durch Einstellen der Beleuchtungsvorrichtung auf einen bestimmten Abstand vom Kulturkasten kann die Beleuchtungsstärke einreguliert werden. Die Algen wurden bei 5000 Lux angezogen.

Beimpfen der Kulturröhren. Die Algen wurden von Schrägagarröhrchen mit sterilem, destilliertem Wasser abgewaschen und anschließend mehrfach mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Jede Kulturröhre erhielt aus einer Pipette die gleiche Algenmenge, je nach Dichte der Suspension 0,5 bis 1,0 ml.

B. Stoffwechselmessungen bei *Rhodopseudomonas spheroides*

Anlage zur Stoffwechselmessung. Die Bestimmung sowohl des lichtabhängigen als auch des aeroben Säureverbrauchs erfolgte nach der Methode von CLAYTON (1955), HENDLEY (1955). Diese beruht auf der

Feststellung des pH-Anstieges durch den Säureverbrauch bzw. Konstanthalten der Wasserstoffionenkonzentration durch Titration mit Salzsäure. Die Menge der hierzu benötigten Salzsäure dient als Maß für den Verbrauch an organischer Säure durch die Bakterien.

Für die Messung des anaeroben Stoffwechsels wurde ein Gefäß (Abb. 3) verwendet, das von der Seite belichtet werden kann und in dem ein seitlich rührender Magnet für eine gute Durchmischung der Bakterien

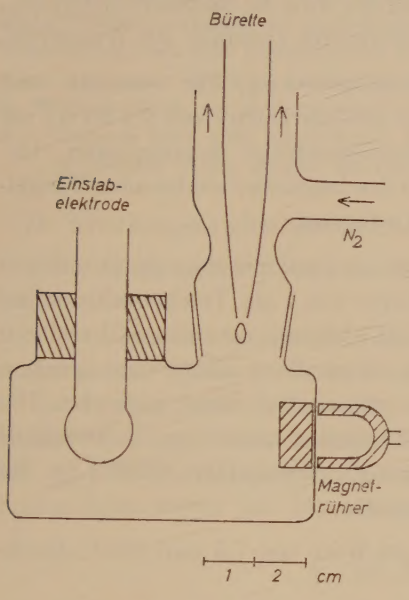


Abb. 3. Gefäß zur Bestimmung des anaeroben Säureverbrauchs durch *Rhodopseudomonas spheroides*.

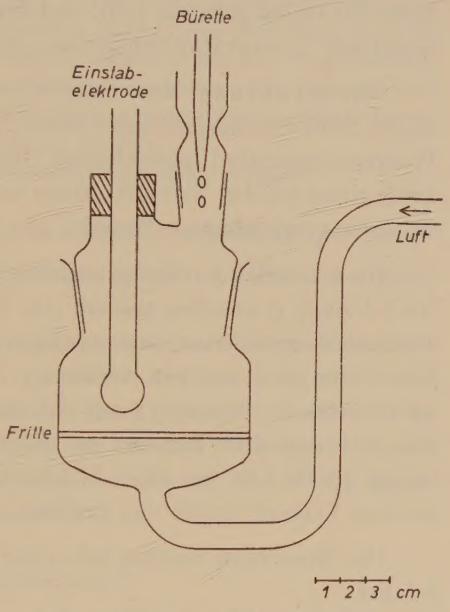


Abb. 4. Gefäß zur Bestimmung des aeroben Säureverbrauchs durch *Rhodopseudomonas spheroides*.

und der zugetropften Salzsäure sorgt. Eine Einstabelektrode (pH-Meter Radiometer/Kopenhagen) wird durch einen Gummistopfen in das Gefäß gesenkt. Über einer zweiten Öffnung, durch die Salzsäure zutropfen kann, befindet sich ein Schliffstutzen mit einer starken Verengung in der Mitte und einer seitlichen Zuführung für Stickstoff. Durch diese Zuleitung kann oberhalb des Bürettenauslaufs, der in den Schliffstutzen bis unterhalb der Verengung hineinragt, ein dauernder Stickstoffstrom in den Stutzen geblasen werden; dadurch sind die anaeroben Bedingungen im Gefäß gesichert. Das Gefäß befindet sich zur Einhaltung konstanter Temperaturverhältnisse in einem mit elektrischer Heizung, Kühlschlange, Rührwerk und Kontaktthermometer ausgestatteten Wasserbad. Seitlich wird mit einer 100-Watt-Lampe belichtet.

Für aerobe Stoffwechselmessungen wurde ein Frittengefäß (Abb. 4) mit einer Gaszuführung am unteren Ende benutzt. Das Gefäß besitzt einen Schliffdeckel mit zwei eingeschmolzenen Glasstutzen. Frittengefäß und Deckel sind schwarz lackiert. Durch einen Stutzen kann die Einstabelektrode in das Gefäß eingeführt, auf den zweiten ein Aufsatz gesteckt werden, der eine Verengung besitzt und hoch genug ist, um seitlich einfallendes Licht nicht in das Gefäß zu lassen. Er dient als Abzug für die durch das Gefäß geleitete Luft, und durch ihn wird die Salzsäure zugegeben. Konstante Temperaturverhältnisse gewährleistet ebenfalls ein Wasserbad.

Durchführung der Stoffwechselmessung. Für anaerobe und aerobe Stoffwechselmessungen wurde bis zu einer Dichte von 0,3 bis 0,7 mg Trockensubstanz/ml gewachsenes Bakterienmaterial herangezogen. Dadurch stand aus den Normalkulturen und den langsamer wachsenden Mangelkulturen vergleichbares Material zur Verfügung.

Die Bakterien wurden abzentrifugiert, zweimal mit einer einprozentigen NaCl-Lösung gewaschen und auf eine Dichte von 1 mg Trockensubstanz/ml mit einer ausgekochten einprozentigen NaCl-Lösung, die einen 0,01 molaren Zusatz von KCl enthielt, verdünnt. Je 10 ml dieser Bakteriensuspension wurde 1 ml 0,1 molarer neutralisierter organischer Säure zugesetzt. Die Beleuchtungsstärke während des lichtabhängigen anaeroben Stoffwechsels betrug 13000 Lux bei einer Lichtsättigung von ungefähr 10000 Lux. Im aeroben Versuch wurde mit Preßluft begast.

Die Messungen wurden bei einem pH-Wert von 7,5 und 30° C durchgeführt.

Als Bezugsgröße für den Stoffwechsel diente der Gesamtstickstoffgehalt der Bakterien. Nach jedem Versuch wurde der Stickstoffgehalt bestimmt und die Meßwerte auf ihn bezogen.

Anaerobe und aerobe Stoffwechselmessungen dauerten 3 Stunden, da in vielen Fällen erst nach 90 Minuten eine vom Licht- bzw. Dunkelstoffwechsel abhängige konstante pH-Veränderung innerhalb der Ableseintervalle von 5 Minuten eintrat.

Die titrimetrische Methode nach CLAYTON hat den Nachteil, daß ihre Genauigkeit mit der Länge der Versuchszeit sinkt. Im Laufe des Versuchs wird in Abhängigkeit von der Stoffwechselintensität und der Stärke der organischen Säure der Zeigerausschlag des pH-Meters geringer. Trotzdem bleibt etwa die Menge der zugegebenen Salzsäure pro Zeiteinheit konstant, aber der Zeigerausschlag des Instrumentes stellt sich nicht mit der ursprünglichen Geschwindigkeit ein, und die genaue Ablesung macht Schwierigkeiten. Die Messungen lassen sich daher bei einem normalen Stoffwechsel nicht über $3^1/_2$ Stunden ausdehnen.

C. Stickstoffbestimmung

Die Stickstoffbestimmung erfolgte nach KJELDAHL.

Zur Erfassung des sogenannten Gesamtstickstoffs wurde eine bestimmte Menge Bakterienmaterials abzentrifugiert und die Bakterien mehrfach mit einprozentiger NaCl-Lösung vor der Veraschung gewaschen.

Der Gehalt an Proteinstickstoff errechnete sich als Differenz zwischen dem Gesamtstickstoff und dem in Trichloressigsäure löslichen Stickstoff (TES-löslicher Stickstoff).

Zur Bestimmung des TES-löslichen Stickstoffs wurden die Bakterien abzentrifugiert, mehrfach mit einer einprozentigen NaCl-Lösung gewaschen, die letzte Waschlösung nach dem Zentrifugieren vorsichtig dekantiert und zum Bakterienrückstand 4 ml einer 5%igen Trichloressigsäurelösung zugegeben. Das Material blieb 25 Minuten stehen, wurde dann scharf abzentrifugiert und in 2 ml der klaren Lösung der Stickstoff nach oben angegebener Methode bestimmt.

In gleicher Weise erfolgte die Stickstoffbestimmung für *Chlorella*.

D. Trockengewichtsbestimmung bei *Rhodopseudomonas spheroides*

Die Trockengewichtsbestimmung erfolgte optisch mit Hilfe einer Eichkurve.

Diese wurde aus den Dichtebestimmungen verschiedener Bakteriensuspensionen bei einer Wellenlänge von 1000 mμ zusammengestellt und in den Proben durch Gefriertrocknung das Trockengewicht bestimmt. Die Eichkurve zeigte einen linearen Verlauf im Bereich zwischen 150 und 500 μg Trockensubstanz/ml. Zur Messung der Dichte diente ein Zeiss-Spektralphotometer mit Monochromator M 4.

E. Wachstumsmaß

Während der Anzucht von *Rhodopseudomonas spheroides* wurden sowohl das Trockengewicht als auch der Gesamtstickstoff bestimmt. Bei der optischen Trockengewichtsbestimmung machten sich mit zunehmender Dauer der Anzucht folgende Fehlerquellen bemerkbar: 1. Verdünnungsfehler, 2. Meßfehler durch stark unterschiedliche Bakteriengröße und damit unterschiedliche Streuung im Spektralphotometer. Das Trockengewicht war daher als Bezugsgröße wenig geeignet.

Die Bestimmung des Gesamtstickstoffs war dagegen mit weniger Fehlerquellen verknüpft. Der Gesamtstickstoff konnte auch deshalb als Bezugsgröße für das Wachstum herangezogen werden, weil während der Anzucht der prozentuale Gehalt der Zellen an TES-löslichem Stickstoff fast konstant blieb, und selbst Eisenmangel nur um 3% den Anteil des TES-löslichen Stickstoffs am Gesamtstickstoff erhöhte (s. S. 22). Der geringe Anteil des TES-löslichen Stickstoffs machte eine Umrechnung auf den Proteinstickstoff nicht erforderlich.

F. Pigmentbestimmung bei *Rhodopseudomonas spheroides*

Zur quantitativen Bestimmung der Pigmente wurden Bakteriochlorophyll und Karotinoide mit Methanol (Merck) extrahiert und spektrophotometrisch das Bakteriochlorophyll in methanolischer Lösung bei 772 mμ bestimmt. Die Karotinoide wurden ebenfalls optisch als „Gesamt-Karotinoide" in Hexan bei 452 mμ erfaßt.

Das verwendete Methanol wurde keiner besonderen Reinigung unterworfen, das Hexan wurde bei 65—67° C durch Destillation gereinigt. Technischer Äther wurde durch Ausschütteln mit Permanganat von etwa vorhandenen Peroxyden befreit und anschließend über metallischem Natrium getrocknet und destilliert.

Die Absorption der Pigmente wurde mit einem Zeiss-Spektralphotometer gemessen.

Die Extraktion der Pigmente erfolgte unmittelbar nach der Probenentnahme aus den Kulturen.

Der grün gefärbte Methanolauszug wurde durch Zentrifugieren von den Rückständen abgetrennt, die Methanolextraktion dreimal wiederholt, und alle Pigmentfraktionen mit Natriumsulfat (wasserfrei, „pro analysi" Merck) getrocknet. Bei besonders materialreichen Proben schloß sich an die Methanolextraktion eine mittels Äther an, um letzte Reste an Karotinoiden zu gewinnen. Diese Ätherfraktion enthielt kein Bakteriochlorophyll und wurde nach dessen Bestimmung dem Methanolextrakt zugegeben und mit diesem zusammen weiterverarbeitet. Zehn Minuten nach der Zugabe des Natriumsulfats zum Methanolextrakt wurde dieses abgetrennt, anschließend mit etwas Methanol ausgewaschen und im auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllten Methanolextrakt das Bakteriochlorophyll bestimmt. Als Extinktionskoeffizient wurde nach SMITH und BENITEZ (1955) 46,1 L/g · cm gewählt.

Um auch die Karotinoide quantitativ erfassen zu können, mußte das Bakteriochlorophyll abgetrennt werden. Der methanolische Pigmentauszug wurde zusammen mit dem Ätherauszug im Vakuum im Exsiccator bei 40° C eingedampft und die Pigmente in Hexan aufgenommen. Auf einer Puderzuckersäule ließ sich durch Hexan das Bakteriochlorophyll von den Karotinoiden abtrennen; es verblieb als schwaches grünes Band im oberen Teil der Säule. Alle roten Pigmente durchliefen die Säule. Der Pigmentgehalt dieser auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllten Hexanfraktion wurde optisch bestimmt. Die nach der Säulenpassage gewonnene rote Fraktion enthielt sämtliche in *Rhodopseudomonas spheroides* vorhandenen Karotinoide. Das Absorptionsspektrum dieser „Gesamt-Karotinoide" zeigte das Hauptmaximum bei 454 mμ. GOODWIN und Mitarbeiter (1955) geben als Lage der Absorptionsmaxima für das in anaeroben Kulturen vorherrschende Pigment Y in Petroläther 426, 452 und 482 mμ an. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte für die Absorptionsmaxima der „Gesamt-Karotinoide" stimmen damit überein.

In vorliegender Arbeit war lediglich der relative Bestand der roten Pigmente und ihr Verhältnis zum Bakteriochlorophyll von Interesse. Daher wurde auf eine weitere Auftrennung der Karotinoidfraktion verzichtet. In der Literatur liegen keine Angaben für den Extinktionskoeffizienten der „Gesamt-Karotinoide" aus *Rhodopseudomonas spheroides* in Hexan vor. Er wurde daher nach GOODWIN (1952) mit 250 L/g · cm festgesetzt.

III. Experimenteller Teil

A. Einfluß des Mangans auf das Wachstum

1. *Rhodopseudomonas spheroides*

a) Wirkungen verschiedener Faktoren auf Normalbakterien und auf die Ausprägung des Manganmangels

α) Gehalt der Nährlösung an EDTA

Normalkulturen von *Rhodopseudomonas* zeigen während der Anzucht folgende Gliederung ihres Wachstumsverlaufs: 1. Anlaufphase, 2. logarithmische Phase, 3. lineares Wachstum, 4. stationäre Phase (Abb. 5). Dieser Wachstumsverlauf entspricht dem normalen Bakterienwachstums, nur war naturgemäß die logarithmische Wachstumsphase sehr kurz.

Kulturen, bei denen Mangan aus der Nährlösung fortgelassen wurde, verhielten sich wie Normalkulturen: erst durch Zugabe von 200 mg EDTA/L traten Abweichungen vom normalen Kurvenverlauf ein. Die gleiche EDTA-Konzentration veränderte in Normalkulturen deren Substanzproduktion und Wachstumsgeschwindigkeit nicht. Geringere EDTA-Konzentrationen beeinflußten das Wachstum von Manganmangelkulturen weniger stark.

Die Manganspuren aus den Nährsalzen reichen nach diesen Befunden aus, um den Manganbedarf der Bakterien zu decken. Erst durch ihre komplexe Bindung an EDTA sinkt der verfügbare Manganspiegel in der Nährlösung so stark, daß Manganmangelsymptome auftreten.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden sämtliche Wachstumsversuche bei einer EDTA-Dosierung von 200 mg/L durchgeführt.

β) Mangankonzentration der Nährlösung bei gleicher EDTA-Dosierung

Eine Versuchsreihe von Kulturen mit verschiedenem Mangangehalt ergab mit dem Mangelgrad zunehmende Veränderungen des Wachstums und der Substanzproduktion (Abb. 5). Es traten folgende Mangelsymptome auf:

1. Verlängerte Anlaufphase, ausgedrückt als Zeit, die von den Bakterien benötigt wurde, um eine Dichte von 20 γ N/ml zu erreichen.
2. Verminderte Wachstumsgeschwindigkeit, ausgedrückt als Tangens der Steigerung im linearen Verlauf der Wachstumskurve im Bereich von 150 γ N/ml.
3. Verringerte Substanzausbeute bei Ende der Anzucht. Der Wert lag aber nur geringfügig unter dem Endwert der Normalkultur.

Die Zeiten, nach denen in Normal- und Manganmangelkulturen ein Gesamtstickstoffgehalt von 20 γ N/ml erreicht war, verhielten sich wie 1 : 2,5; die Wachstumsgeschwindigkeiten aber nur wie 1 : 1,3. Das verzögerte Anwachsen kann daher nicht allein durch die verminderte Wachs-

tumsgeschwindigkeit erklärt werden. Beide Symptome müssen verschiedene Ursachen haben.

Drei Möglichkeiten kommen für die Verzögerung des Anwachsens in Betracht: 1. Adaptation an den Manganmangel, 2. Veränderung der komplexen Bindung des Mangans an EDTA, 3. Entfernung des EDTA aus der Nährlösung infolge Verarbeitung durch die Bakterien.

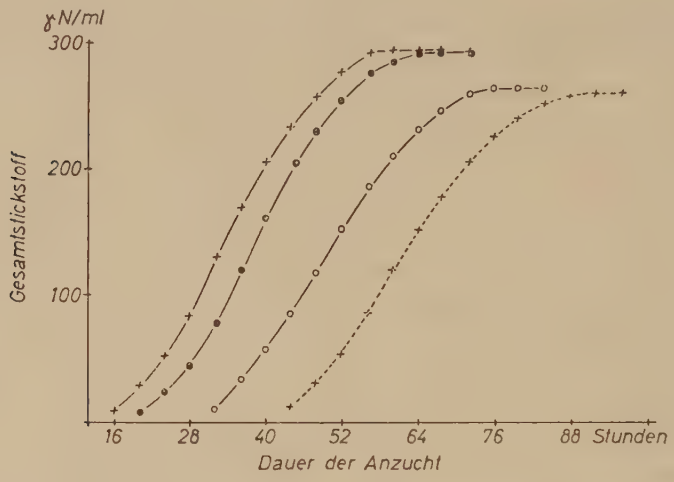


Abb. 5. Wachstum (Zunahme des Gehalts an Gesamtstickstoff) von *Rhodopseudomonas* in Malat-Medium in Abhängigkeit vom Mangangehalt der Nährlösung. EDTA-Gehalt sämtlicher Kulturen 200 mg/L.

+——+ $9 \cdot 10^{-6}$ Mol Mn^{++}/L
•——• $9 \cdot 10^{-7}$ Mol Mn^{++}/L
o——o $9 \cdot 10^{-8}$ Mol Mn^{++}/L
+ — — — + ohne Zugabe von Mangan in die Nährlösung

Eine Adaptation an den Manganmangel liegt nicht vor. Mit Manganmangelbakterien beimpfte Normalkulturen und Mangelkulturen zeigen im wesentlichen den gleichen Unterschied wie mit gewaschenen Normalbakterien beimpfte. Kleine Abweichungen liegen im Schwankungsbereich paralleler Wachstumsversuche und bedeuten keine Zunahme der Mangelausprägung.

Eine Veränderung der komplexen Bindung des Mangans an EDTA könnte auf einer Änderung der Wasserstoffionenkonzentration beruhen. Diese sank in der Normal- wie in der Mangelkultur bis zum Wachstumsende. Es kann daher anfangs in der Kulturlösung eine andere Bindung des Mangans vorliegen als in der alkalisch gewordenen älteren Nährlösung. Der Wachstumsbeginn der Mangelkulturen war aber nicht die Folge einer langsamen pH-Änderung, denn die Wasserstoffionenkonzentration blieb bis

zum Wachstumsbeginn konstant und nahm erst parallel zu einer deutlichen Substanzproduktion ab.

Die einzige Erklärung des verzögerten Anwachsens ist daher in einer Verarbeitung des EDTA durch die Bakterien zu suchen. Durch einen solchen Abbau muß Mangan in zunehmendem Maße frei und endlich eine Schwelle der Mangankonzentration in der Nährlösung erreicht werden, bei der ein deutliches Wachstum einsetzen kann.

Nur die gebremste Wachstumsgeschwindigkeit in der Manganmangelkultur ist daher direkt auf Manganmangel zurückzuführen, weniger das verzögerte Anwachsen.

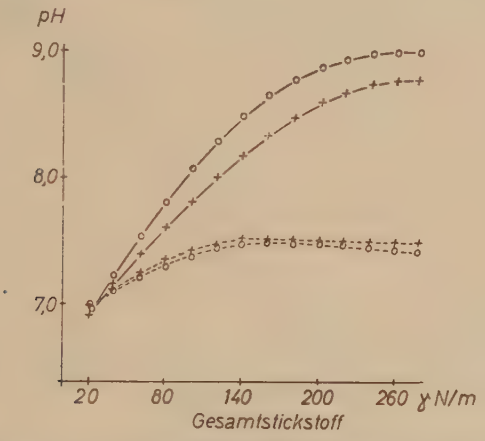


Abb. 6. Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration während der Kultur von *Rhodopseudomonas* in einem Malat-Medium in Abhängigkeit von der Substanzproduktion (Gesamtstickstoff), dem Mangangehalt der Nährlösung und von der Begasung mit Kohlendioxyd.

+ — — — — + Normalkultur, + CO_2
+ ———— + Normalkultur, — CO_2
o — — — — o Manganmangelkultur, + CO_2
o ———— o Manganmangelkultur, — CO_2

γ) Konzentration der Nährlösung, Wasserstoffionenkonzentration, Begasung mit Kohlendioxyd

Der Stillstand der Substanzproduktion in Normal- und Mangelkulturen konnte durch eine erhöhte Konzentration der Nährlösung an Malat und Mineralsalzen nicht aufgehoben werden.

Die Wasserstoffionenkonzentration in Normal- und in Manganmangelkulturen sank während der Anzucht parallel zum Verbrauch an Malat und zum Anstieg des Gesamtstickstoffgehaltes der Kulturen (Abb. 6). Sie verringerte sich in den Mangelkulturen schneller als in Kulturen mit normalem Mangangehalt und zeigte damit einen größeren Verbrauch an

Malat bei verringerter Substanzproduktion an. Dies deutet auf eine durch den Manganmangel im Verhältnis zum Umsatz verringerte Substratausnutzung hin.

Um die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für das Wachstum von Normal- und Mangelbakterien zu prüfen, wurde bei Wachstumsstillstand der pH-Wert der Kulturen durch Salzsäure auf den Ausgangswert gebracht. Diese nachträgliche pH-Veränderung blieb aber ohne Einfluß, der Wachstumsstillstand war irreversibel.

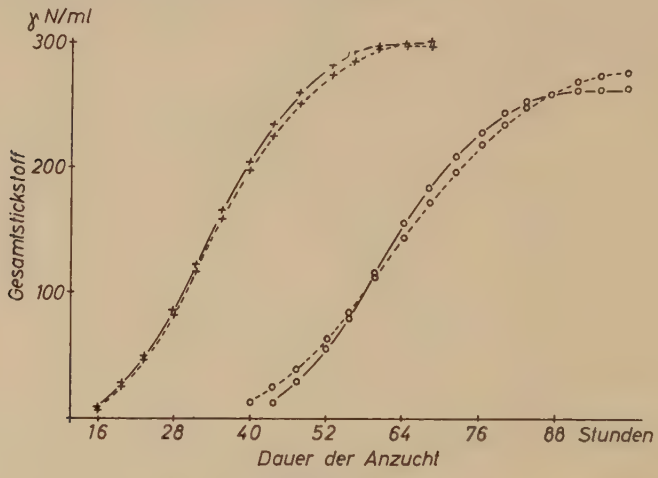


Abb. 7. Wachstum (Zunahme des Gehalts an Gesamtstickstoff) von *Rhodopseudomonas* in Malat-Medium in Abhängigkeit vom Mangangehalt der Nährlösung und von der Begasung mit Kohlendioxyd.

+— — — —+ Normalkultur, + CO_2
+————————+ Normalkultur, — CN_2
o— — — —o Manganmangelkultur, + CO_2
o————————o Manganmangelkultur, + CO_2

Durch dauernde Zufuhr an Kohlendioxyd gelang es, den pH-Wert während der gesamten Kulturdauer im physiologisch günstigen Bereich zwischen 7,0 und 7,5 zu halten. Aber auch bei diesen pH-Bedingungen steigerte sich die Substanzproduktion weder in Normalkulturen noch in Manganmangelzuchten.

Mit Hilfe der Begasung mit Kohlendioxyd wurde gleichzeitig die Frage beantwortet, ob Kohlendioxyd Wachstum und Ausnützung des Malats durch die Bakterien günstig beeinflußt.

Die Kohlendioxydzufuhr förderte aber weder in Normal- noch in Mangelkulturen das Wachstum und die Substanzproduktion, sondern verlangsamte sogar die Wachstumsgeschwindigkeit (Abb. 7).

Wenn die Konzentration der Nährlösung erhöht und gleichzeitig der pH-Wert konstant gehalten wurde, ließ sich eine Steigerung der Substanzproduktion erreichen, da durch den physiologisch günstigen Einfluß der gleichbleibenden Wasserstoffionenkonzentration eine größere Malatmenge im Laufe der Anzucht verarbeitet werden konnte (Abb. 8). In diesen Versuchen wurde das Wachstum während 136 Stunden verfolgt. Gegen Ende dieser Kulturzeit verlangsamte es sich in Manganmangelkulturen bedeutend, ein deutliches Zeichen von ausgeprägtem Manganmangel. Nur diese starke Wachstumsverlangsamung ist die Folge des

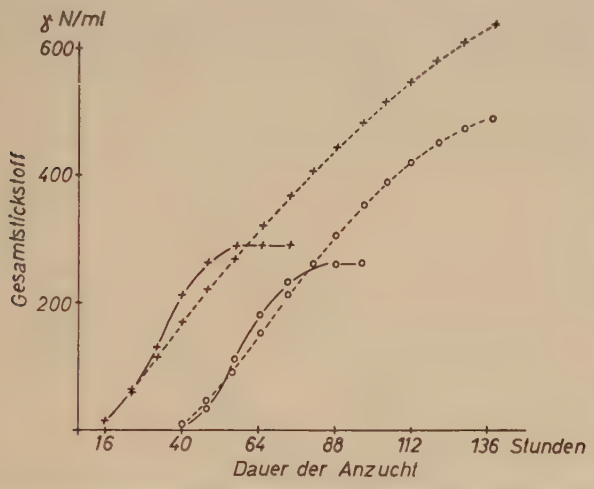


Abb. 8. Wachstum (Zunahme des Gehalts an Gesamtstickstoff) von *Rhodopseudomonas* in Abhängigkeit vom Mangangehalt der Nährlösung und von der Begasung mit Kohlendioxyd.
Doppelte Konzentration der Nährlösung. Anzucht in Malat-Medium.

+ — — — — + Normalkultur, + CO_2
+ ———— + Normalkultur, — CO_2
o — — — — o Manganmangelkultur, + CO_2
o ———— o Manganmangelkultur, — CO_2

starken Manganmangels. Der Wachstumsstillstand in den nicht mit Kohlendioxyd begasten Mangelkulturen geht hauptsächlich auf andere Ursachen zurück; Manganmangel wirkt in diesen Mangelkulturen nur geringfügig hemmend auf das Wachstum.

Die mit Kohlendioxyd begasten Kulturen mit doppelter Konzentration der Nährlösung hatten aber beim Auftreten der starken Wachstumsverlangsamung schon einen so hohen Substanzgehalt (480 γ N/ml), daß der Lichtgenuß stark vermindert war. Die Bakterien neigten außerdem in Normal- wie in Mangelkulturen zum Klumpen, und die Untersuchungen ließen sich nicht über 136 Stunden ausdehnen.

δ) Verschiedene Wasserstoffdonatoren

Da sich die Wirkung des Mangans als unabhängig von der Begasung mit Kohlendioxyd erwies, galt als nächster Punkt zu untersuchen, ob dieses Ion spezifisch auf den Malatabbau oder über alle Wasserstoffdonatoren auf das Wachstum einwirkt. In der Nährlösung zur Anzucht der Bakterien wurde daher das Malat durch Pyruvat bzw. Azetat ersetzt.

Die Bakterien wuchsen in Kulturmedien mit Pyruvat und Malat übereinstimmend. Dagegen war in Azetatkulturen das Wachstum gegenüber dem in Malatnährlösung verlangsamt. Ebenso lag die Substanzproduktion niedriger und betrug bei normalem Mangangehalt nur rund 70%, bei Manganmangel ungefähr 50% der Substanzproduktion einer Malatkultur.

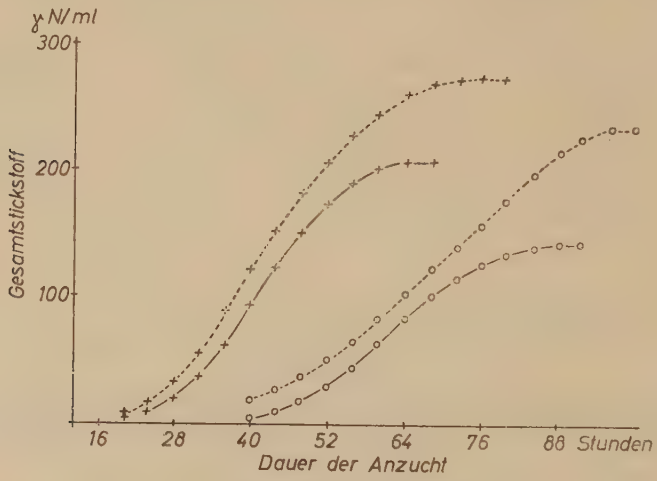


Abb. 9. Wachstum (Zunahme des Gehalts an Gesamtstickstoff) von *Rhodopseudomonas* in Azetat-Medium in Abhängigkeit vom Mangangehalt der Nährlösung und von der Begasung mit Kohlendioxyd.

+— — — —+ Normalkultur, + CO_2
+————+ Normalkultur, — CO_2
o— — — —o Manganmangelkultur, + CO_2
o————o Manganmangelkultur, — CO_2

Diese Abweichung bei der Azetatanzucht der Bakterien beruht auf dem viel schnelleren Anstieg des pH-Wertes in diesem Medium. Im Verhältnis zur erzielten Substanzproduktion stieg er ungefähr drei- bis viermal schneller als in der Nährlösung mit Malat.

Für diesen steilen pH-Verlauf ist wahrscheinlich ein Azetatumsatz mit geringerer Ausbeute als beim Malatumsatz verantwortlich; etwa infolge ungleichwertiger Verarbeitung der Methyl- und der Carboxylgruppe

(Kamen und Mitarbeiter 1951). Normal- und Mangelkulturen gelangen daher schon bei geringer Substanzproduktion in einen physiologisch giftigen, das Wachstum hemmenden pH-Bereich.

Beim Manganmangel trat außerdem wie bei der Anzucht mit Malat und Pyruvat eine gegenüber der Normalkultur verringerte Substanzproduktion auf.

Wurden Azetatkulturen mit Kohlendioxyd begast und dadurch die Wasserstoffionenkonzentration in günstigen Bereichen gehalten, so ließ sich bei einer normalen Konzentration an Azetat im Gegensatz zu den Befunden bei einer reinen Malatkultur eine Steigerung der Substanzproduktion erzwingen und ungefähr derselbe Wert wie in einem Malatmedium erreichen (Abb. 9). Die Ursache liegt in der völligen Ausnutzung des Azetats bei der konstanten Wasserstoffionenkonzentration.

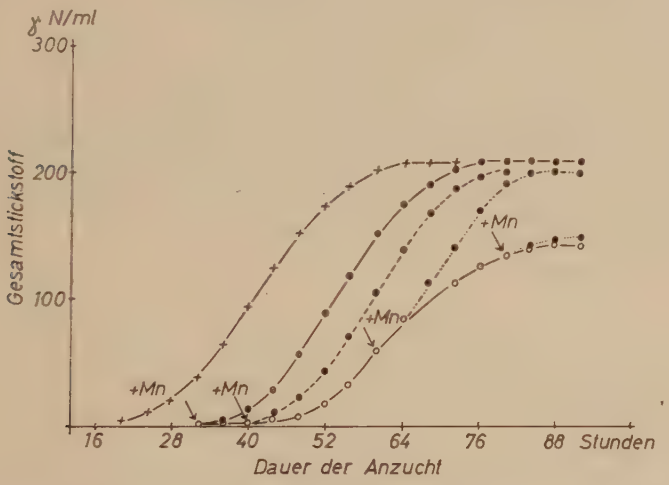
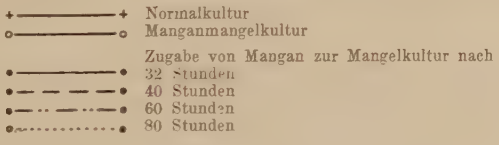


Abb. 10. Wirkung der Zugabe von Mangan in die Nährlösung zu verschiedenen Zeiten auf das Wachstum von Manganmangelkulturen von *Rhodopseudomonas*. Anzucht in Azetat-Medium.



Die Manganwirkung auf das Wachstum darf auf Grund dieser Befunde als unabhängig von der Art der für die Anzucht verwendeten Wasserstoffdonatoren Malat, Pyruvat und Azetat angesehen werden.

b) Wirkung der Zugabe von Mangan auf das Wachstum von Manganmangelkulturen

Für die Analyse eines Schwermetallmangels ist die Frage von Bedeutung, ob sich eine Hemmung durch Zugabe des fehlenden Ions aufheben läßt. Erhielten die Manganmangel-Azetatkulturen nach verschiedenen Zeiten (32, 40, 60, 80 Stunden) Mangan, so wurde das Wachstum gefördert, jedoch ließ es sich in älteren Kulturen nur noch geringfügig erhöhen (Abb. 10).

Die Wachstumshemmung wurde nicht sofort durch die Zugabe von Mangan aufgehoben. Zwar setzte ein deutlicher Anstieg des Wachstums schon nach 4 Stunden ein, aber eine normale Substanzproduktion zeigten junge, bis 60 Stunden alte Mangelkulturen erst nach 8—12 Stunden.

Die geringe Wirkung des Mangans in den alten Mangelkulturen deutet auf eine allgemeine Veränderung des physiologischen Zustandes hin, die eine völlige Aufhebung des Mangels verhindert.

2. *Chlorella vulgaris*

Um die Wirkung des Mangans auf *Chlorella vulgaris* und auf *Rhodopseudomonas spheroides* vergleichen zu können, wurde der Einfluß des EDTA auf die Ausprägung des Manganmangels bei *Chlorella* untersucht (Abb. 11).

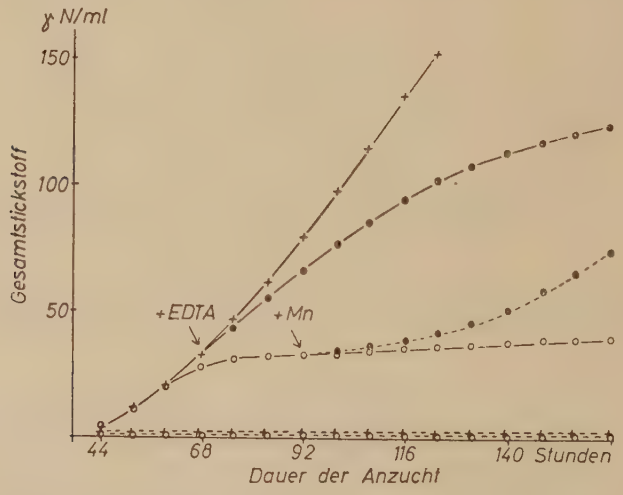


Abb. 11. Wachstum (Zunahme des Gehalts an Gesamtstickstoff) von *Chlorella vulgaris* in Abhängigkeit vom Gehalt der Nährlösung an Mangan und EDTA.

+ — — — — + Normalkultur + EDTA
o — — — — o Manganmangelkultur, + EDTA
+ ——————— + Normalkultur
o ——————— o Manganmangelkultur
• ——————— • Zugabe von EDTA zur Normalkultur
• — — — — • Zugabe von Mangan zur Mangelkultur

Die Nährlösung für diese Versuche enthielt neben den normalen Nährsalzen Glutaminsäure und Malat in denselben Konzentrationen wie die Nährlösung für *Rhodopseudomonas*, um eine mögliche Verunreinigung an Mangan in gleichen Grenzen zu halten.

Es zeigte sich, daß die Algen bei einer EDTA-Konzentration von 200 mg/L weder in Normal- noch in Mangelkulturen wuchsen. Ebenso senkte die Zugabe von EDTA in eine angewachsene Normalkultur sofort deren Wachstumsrate. Die gleiche EDTA-Konzentration, bei der *Rhodopseudomonas* noch wachsen konnte, erniedrigte also den Manganspiegel für *Chlorella* so sehr, daß überhaupt kein Wachstum erfolgte.

In Manganmangelkulturen von *Chlorella* ohne EDTA verlangsamte sich das Wachstum schon kurz nach Beginn der Anzucht und führte zu einem von starker Verklumpung der Algen begleiteten völligen Wachstumsstillstand.

Die Wachstumshemmung konnte durch Zufuhr von Mangan aufgehoben werden, doch trat die wachstumsfördernde Wirkung erst ungefähr 24 Stunden nach seiner Zugabe deutlich in Erscheinung.

Ein Vergleich des Wachstumsverlaufs und der Wirkung des Mangans auf die Substanzproduktion von *Rhodopseudomonas* und *Chlorella* ergibt folgende Unterschiede:

1. Bei Manganmangel führt die Zugabe von 200 mg EDTA/L in die Nährlösung bei *Chlorella* zum völligen Wachstumsstillstand, bei *Rhodopseudomonas* wirkte sie lediglich verlangsamend auf die Wachstumsgeschwindigkeit.

2. Während Manganmangelkulturen von *Chlorella* schon nach ungefähr 80 Stunden mit der Substanzproduktion aufhörten und ihr Gesamtstickstoffgehalt zu diesem Zeitpunkt nur 60% des Gehalts einer Normalkultur betrug, stellte sich eine starke Wachstumsverminderung in Mangelkulturen von *Rhodopseudomonas* erst nach 5 Tagen ein; der Gesamtstickstoffgehalt lag zu diesem Zeitpunkt bei 80% des Normalwertes.

B. Einfluß des Eisens auf das Wachstum

1. *Rhodopseudomonas spheroides*

In Kulturen mit abgestuftem Eisengehalt traten mit sinkender Eisenkonzentration zunehmende spezifische Mangelerscheinungen auf.

Von Kulturbeginn war das Wachstum verlangsamt. Es sank bei stärkstem Eisenmangel nach ungefähr 80 Stunden auf ein Minimum, und der Trockengewichts- und Gesamtstickstoffgehalt betrugen nur rund 70% des Gehalts einer gleichalterigen Normalkultur (Abb. 12).

Schon bei einer Eisenkonzentration von $1{,}8 \cdot 10^{-7}$ Mol/L prägten sich diese Mangelerscheinungen so stark aus, daß sie auch durch völliges Weglassen der Eisensalze aus der Nährlösung nur noch unbedeutend verstärkt werden konnten.

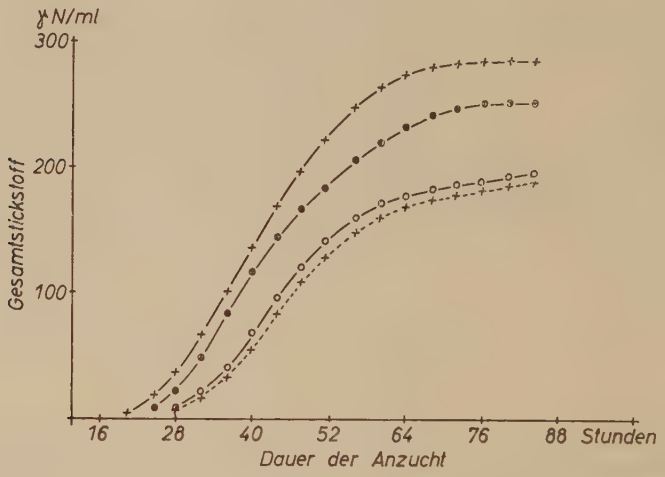


Abb. 12. Wachstum (Zunahme des Gehalts an Gesamtstickstoff) von *Rhodopseudomonas* in Abhängigkeit vom Eisengehalt der Nährlösung. Anzucht in Malat-Medium.

+——— + $1{,}8 \cdot 10^{-5}$ Mol Fe^{++}/L
•——— • $1{,}8 \cdot 10^{-6}$ Mol Fe^{++}/L
○——— ○ $1{,}8 \cdot 10^{-7}$ Mol Fe^{++}/L
+ — — — + ohne Eisenzugabe in die Nährlösung

Versuche mit Malat- und Azetatnährlösungen ergaben, daß die Wirkung des Eisens von der Art der für die Anzucht der Bakterien verwendeten Wasserstoffdonatoren unabhängig ist.

Durch Begasen mit Kohlendioxyd konnte bei gleichzeitiger Verdoppelung der Nährlösungskonzentration die Substanzausbeute der Eisenmangelkulturen erhöht werden (Abb. 13). Die Wachstumskurve verlief steiler als in unbegasten Kulturen, da der hemmende Einfluß der sinkenden Wasserstoffionenkonzentration nicht auftreten konnte. Doch erreichte das Wachstum ungefähr zur selben Zeit wie in den unbegasten Kulturen ein Minimum, und nach 80 Stunden betrug die Differenz zur Substanzproduktion einer in gleicher Weise angezogenen Normalkultur ebenfalls ungefähr 30%. Das weitere Wachstum war sehr gering.

Durch die Zugabe von Eisen konnte der Mangelzustand aufgehoben werden (Abb. 14). Die ehemaligen Mangelkulturen erreichten aber in keinem Fall den Endsubstanzgehalt einer Normalkultur. In diesem Punkt wich die Wirkung des Eisens auf Eisenmangelkulturen von der des Mangans auf

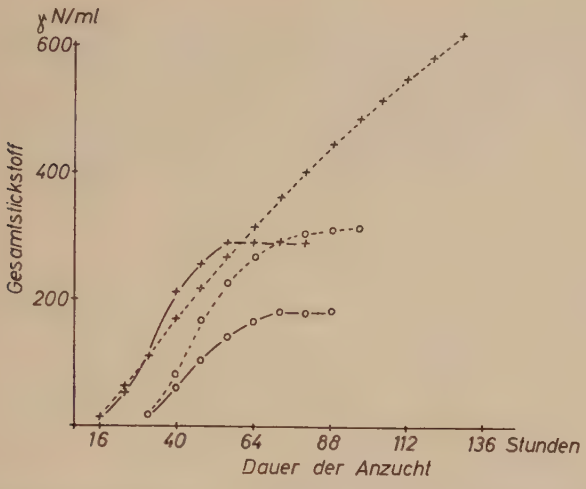


Abb. 13. Wachstum (Zunahme des Gehalts an Gesamtstickstoff) von *Rhodopseudomonas* in Abhängigkeit vom Eisengehalt der Nährlösung und von der Begasung mit Kohlendioxyd.
Doppelte Konzentration der Nährlösung. Anzucht in Malat-Medium.

+ — — — + Normalkultur, + CO_2
+ ——— + Normalkultur, — CO_2
o — — — o Eisenmangelkultur, + CO_2
o ——— o Eisenmangelkultur, — CO_2

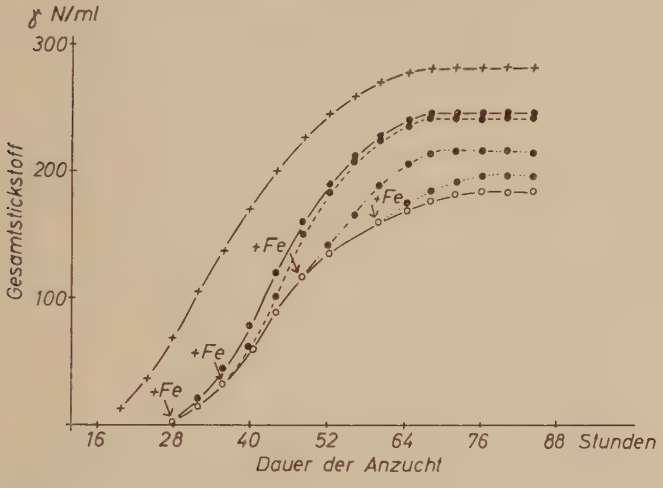


Abb. 14. Wirkung der Zugabe von Eisen zu verschiedenen Zeiten in die Nährlösung auf das Wachstum (Zunahme des Gehalts an Gesamtstickstoff) von Eisenmangelkulturen von *Rhodopseudomonas*. Anzucht in Malat-Medium.

+ ——— + Normalkultur
o ——— o Eisenmangelkultur
Zugabe von Eisen zur Mangelkultur nach
o — — — • 28 Stunden
• ——— • 36 Stunden
o — · — · — • 48 Stunden
• ····· • 60 Stunden

Manganmangelkulturen ab, bei denen in jungen Kulturen ungefähr der gleiche Endsubstanzgehalt wie in der Normalkultur erreicht wurde. Parallel zu den Ergebnissen beim Manganmangel zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Wachstumsförderung von der Dauer der Anzucht; in alten Kulturen trat nur noch eine geringfügige Steigerung nach Zugabe des Mangelions ein.

2. *Chlorella vulgaris*

Bei *Chlorella vulgaris* hemmte Eisenmangel ebenfalls das Wachstum. Mit der Dauer der Kultur sank die Substanzproduktion immer weiter ab. Ein völliger Wachstumstillstand trat nicht ein.

Durch Zugabe von Eisen ließ sich der Mangel sofort aufheben.

Ein Vergleich der Eisenmangelwirkung auf das Wachstum von *Rhodopseudomonas* und *Chlorella* ergibt keine grundsätzlichen Unterschiede.

C. Einfluß von Mangan und Eisen auf Stickstoffgehalt und Pigmente bei *Rhodopseudomonas spheroides*

1. Stickstoffgehalt

In der Normalkultur traten während der Anzucht zwei Abschnitte mit unterschiedlichem Verhältnis der Stickstofffraktionen auf; in jungen Kulturen lag der Anteil des TES-löslichen Stickstoffs am Gesamtstickstoff bei ungefähr 4%, in alten Kulturen bei 6% (Abb. 15). Der Anstieg des löslichen Stickstoffs war nicht kontinuierlich, sondern auf 8—12 Stunden beschränkt. Vorher und nachher änderten sich die prozentualen Verhältnisse nicht. Die Zunahme des löslichen Stickstoffs setzte ein, wenn ungefähr 80% des Gesamtstickstoffgehalts bei Kulturende erreicht waren und die Substanzproduktion nicht mehr linear zur Kulturdauer zunahm.

Manganmangel veränderte den Anteil des TES-löslichen Stickstoffs am Gesamtstickstoff gegenüber den Normalkulturen nicht. Die kurzfristige Zunahme des löslichen Stickstoffs begann zur gleichen Zeit wie in der Normalkultur (Abb. 15).

Dagegen ergab die Analyse des Stickstoffgehalts bei starkem Eisenmangel einen um rund 30% erhöhten Gehalt an TES-löslichem Stickstoff (Abb. 16). Die Zunahme setzte bei einem Gesamtstickstoffgehalt von rund 70% des Endwertes ein. Sie verlief steiler und dauerte etwas länger als bei normalem Eisengehalt in der Nährlösung. Abstufungen des Eisenmangels lagen mit ihren Analysedaten zwischen einer Normalkultur und stärkstem Eisenmangel.

Die Erklärung der Steigerung des Gehalts an TES-löslichem Stickstoff ist auf zweierlei Weise möglich:

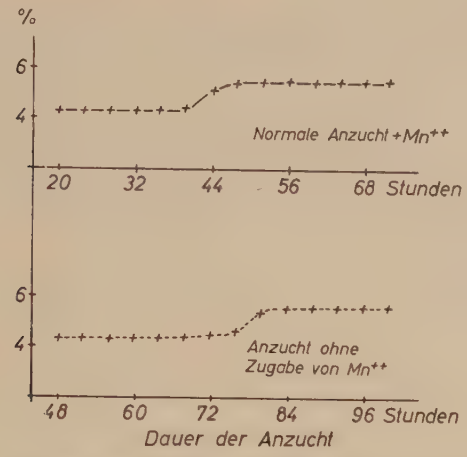


Abb. 15. Prozentualer Anteil des TES-löslichen Stickstoffs am Gesamtstickstoffgehalt von *Rhodopseudomonas* in Abhängigkeit vom Mangangehalt der Nährlösung.

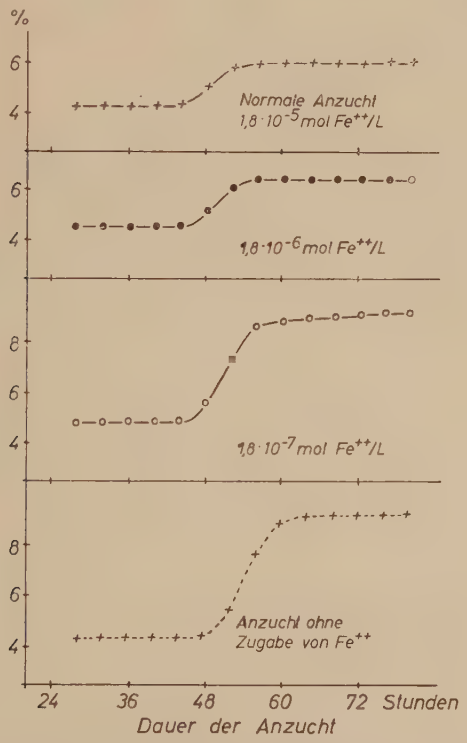


Abb. 16. Prozentualer Anteil des TES-löslichen Stickstoffs am Gesamtstickstoffgehalt von *Rhodopseudomonas* in Abhängigkeit vom Eisengehalt der Nährlösung.

1. Eine durch die Kulturdauer hervorgerufene Proteolyse führt zum Anstieg des TES-löslichen Stickstoffs. Diese ist aber wenig wahrscheinlich, da eine weitere Zunahme des löslichen Stickstoffs bis zum Stillstand der Substanzproduktion nicht auftrat.

2. Bei dem betreffenden Kulturalter hemmen physiologische Altersschädigungen die Eiweißsynthese und lösliche Stickstoffverbindungen — entweder Proteinbausteine oder Stickstoffverbindungen, die in jungen Zellen nur beschränkt vorhanden sind — häufen sich an.

Der durch Eisenmangel erhöhte Gehalt an löslichem Stickstoff geht möglicherweise auf eine Hemmung der Proteinsynthese und anderer Syntheseprozesse und dadurch geförderte Synthese anderer Stickstoffverbindungen zurück. LASCELLES (1955) stellte an *Rhodopseudomonas spheroides* bei Eisenmangel einen um das Zehnfache gesteigerten Gehalt an Porphyrinen fest. Die durch diesen Mangel verursachte Zunahme des TES-löslichen Stickstoffs könnte daher zum Teil auf einer erhöhten Synthese an Porphyrinen beruhen.

Die völlige Klärung dieses Problems bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

2. Pigmente

Der Gehalt der Normalkultur an Bakteriochlorophyll und an Karotinoiden stieg zu Beginn des Wachstums steil, mit zunehmender Kulturdauer langsamer an (Abb. 17). Er erreichte erst bei Kulturende einen Maximalwert, von dem er nach Wachstumsstillstand gelegentlich mehr oder weniger abfallen konnte. Zur Zeit des Wachstumsbeginns war das Verhältnis zwischen Bakteriochlorophyll und Gesamt-Karotinoiden ungefähr 7 : 1 bis 8 : 1; erniedrigte sich aber bald auf einen Wert zwischen 4,5 : 1 und 5 : 1. Nach dem Wachstumsstillstand konnten die Karotinoide und damit auch ihr Anteil am Gesamtpigmentgehalt noch geringfügig zunehmen.

Weder durch verschiedene Wasserstoffdonatoren noch durch Begasen mit Kohlendioxyd konnte der Pigmentgehalt beeinflußt werden.

Der Pigmentgehalt der Kulturen war stark von den Beleuchtungsverhältnissen und vom Alter des Impfmaterials abhängig. Es konnten Schwankungen der Analysedaten bis zu 15% auftreten, doch blieb die Wirkung der Spurenelemente von diesen Einflüssen unberührt. COHEN-BAZIRE und Mitarbeiter (1957), ebenso STANIER (1959) erhielten bei Untersuchungen des Pigmentgehalts von *Rhodopseudomonas spheroides* ebenfalls in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke Schwankungen im Bakteriochlorophyll/Karotinoid-Verhältnis zwischen 3,0 : 1 und 4,8 : 1.

Mangan mangel bewirkte keine deutliche Veränderung des Gehalts an Bakteriochlorophyll oder an Karotinoiden. Die Bakterienfarbstoffe nahmen zwar etwas langsamer als bei normalem Mangangehalt der Nährlösung zu, erreichten bei Kulturende aber stets den Normalwert.

Eisenmangel wirkte stets hemmend auf die Synthese des Bakteriochlorophylls und der Karotinoide (Abb. 17 und 18). Das Verhältnis Bakterio-

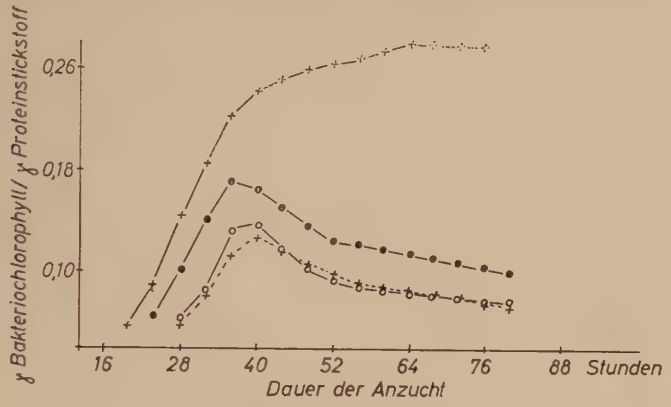


Abb. 17. Bakteriochlorophyllgehalt von *Rhodopseudomonas* in Abhängigkeit vom Eisengehalt der Nährlösung.

+——— + $1{,}8 \cdot 10^{-5}$ Mol Fe^{++}/L
•——— • $1{,}8 \cdot 10^{-6}$ Mol Fe^{++}/L
o——— o $1{,}8 \cdot 10^{-7}$ Mol Fe^{++}/L
+ — — — + ohne Eisenzugabe in die Nährlösung

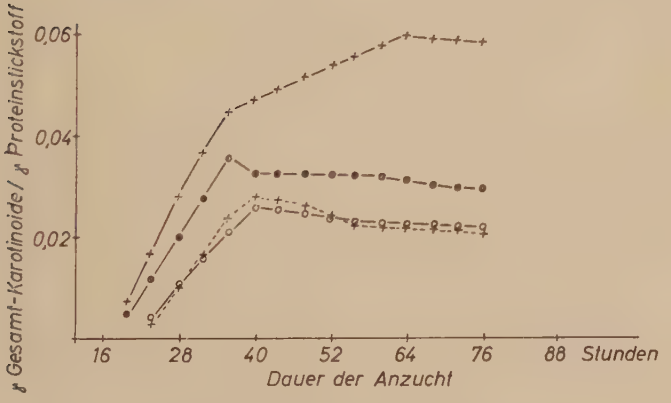


Abb. 18. Gehalt an Gesamtkarotinoiden von *Rhodopseudomonas* in Abhängigkeit vom Eisengehalt der Nährlösung.

+——— + $1{,}8 \cdot 10^{-5}$ Mol Te^{++}/L
•——— • $1{,}8 \cdot 10^{-6}$ Mol Fe^{++}/L
o——— o $1{,}8 \cdot 10^{-7}$ Mol Fe^{++}/L
+ — — — + ohne Zugabe von Eisen in die Nährlösung

chlorophyll/Proteinstickstoff stieg in den Eisenmangelkulturen während der ersten 40 Stunden der Anzucht. Dann wurde die Bakteriochlorophyllsynthese aber stärker als die des Proteins gehemmt, und das Verhältnis sank bis zum Kulturende. Der Gehalt an Gesamt-Karotinoiden lag bei Eisenmangel ebenfalls seit Kulturbeginn unter dem einer Normalkultur; aber der Abfall war nach dem Überschreiten des für den jeweiligen Eisenmangelgrad charakteristischen Maximalwertes weniger ausgeprägt als beim Bakteriochlorophyll.

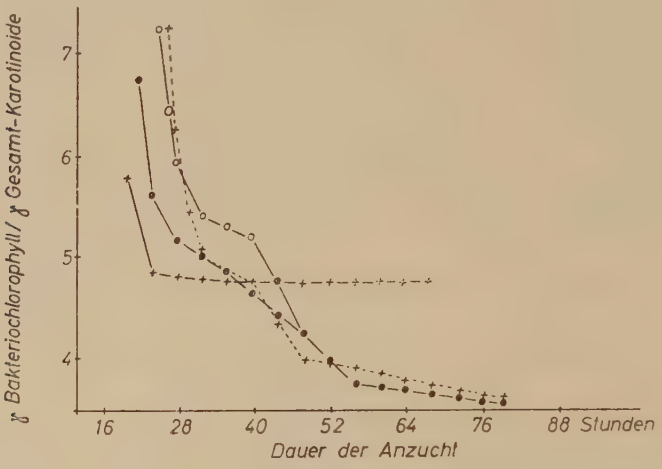


Abb. 19. Verhältnis Bakteriochlorophyll/Gesamtkarotinoide im Verlaufe der Anzucht von *Rhodopseudomonas* bei verschiedenen Eisenkonzentrationen der Nährlösung.

+——+ $1{,}8 \cdot 10^{-5}$ Mol Fe^{++}/L
•——• $1{,}8 \cdot 10^{-6}$ Mol Fe^{++}/L
o——o $1{,}8 \cdot 10^{-7}$ Mol Fe^{++}/L
+ — — — — + ohne Zugabe von Eisen in die Nährlösung

Da die Bakteriochlorophyllsynthese stärker abnahm als die Synthese der roten Farbstoffe, wurde das Verhältnis der Pigmentgruppen zueinander mit dem Kulturalter immer kleiner und betrug bei Kulturende mit 3,5 : 1 nur noch 80% des Normalwertes (Abb. 19).

Die Zugabe von Eisen zur Mangelkultur bewirkte einen sofortigen Anstieg der Pigmente (Abb. 20 und 21). In alten Kulturen war aber nur noch eine geringfügige Steigerung der Pigmentsynthese möglich. Die Zunahme des Bakteriochlorophylls war größer als die Steigerung der Proteinsynthese; das Verhältnis Bakteriochlorophyll/Proteinstickstoff nahm langsam zu. Das Bakteriochlorophyll wurde stärker als die Karotinoide synthetisiert, so daß das Verhältnis der Pigmente zueinander sich erhöhte (Abb. 22). Es wurde aber nicht völlig normalisiert.

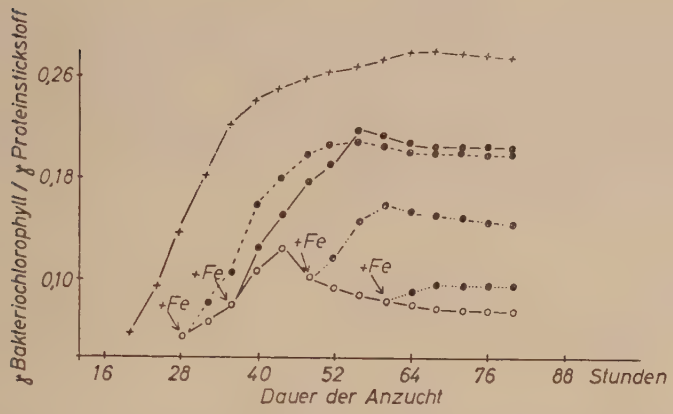
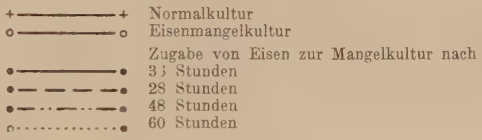


Abb. 20. Wirkung der Zugabe von Eisen zu verschiedenen Zeiten in die Nährlösung auf den Bakteriochlorophyllgehalt in Eisenmangelkulturen von *Rhodopseudomonas*.



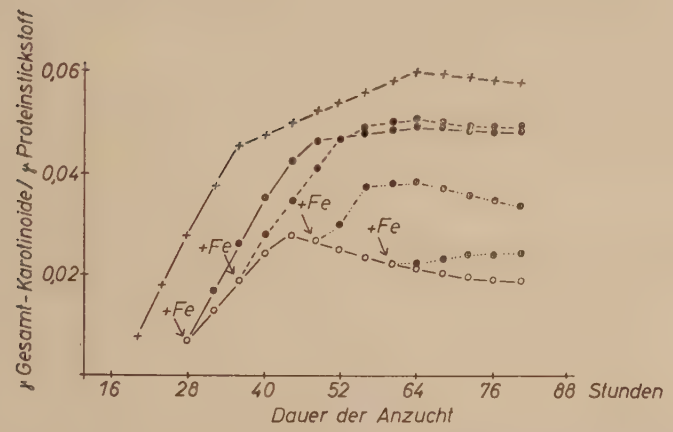
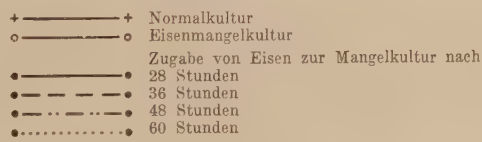


Abb. 21. Wirkung der Zugabe von Eisen zu verschiedenen Zeiten in die Nährlösung auf den Gehalt an Gesamtkarotinoiden in Eisenmangelkulturen von *Rhodopseudomonas*.



Diese Ergebnisse bestätigen für *Rhodopseudomonas spheroides* nicht die Befunde von ZIRPEL (1941) an *Rhodopseudomonas palustris*, der eine Unabhängigkeit der Karotinoidsynthese vom Eisengehalt des Kulturmediums feststellte. Immerhin sind auch am Objekt der vorliegenden Untersuchung die Karotinoide weniger extrem vom Eisenmangel betroffen als das Bakteriochlorophyll.

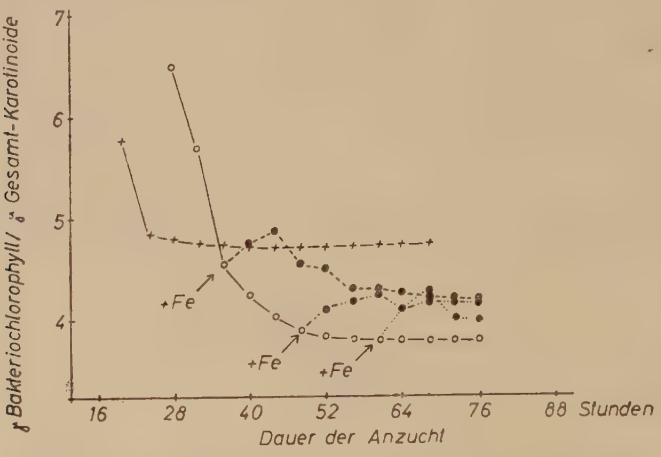


Abb. 22. Wirkung der Zugabe von Eisen zu verschiedenen Zeiten in die Nährlösung auf das Verhältnis Bakteriochlorophyll/Gesamtkarotinoide in Eisenmangelkulturen von *Rhodopseudomonas*.

Normalkultur
Eisenmangelkultur
Zugabe von Eisen zur Mangelkultur nach
36 Stunden
48 Stunden
60 Stunden

D. Stoffwechselphysiologisches Verhalten von *Rhodopseudomonas spheroides*

1. Anaerobe Verarbeitung organischer Säuren durch Normalbakterien

Die Anzucht von *Rhodopseudomonas spheroides* für Versuche, in denen die Verarbeitung der verschiedenen organischen Säuren geprüft wurde, erfolgte stets in einem Malat-Glutaminsäure-Medium. Das stoffwechselphysiologische Verhalten bei einer Anzucht der Bakterien auf anderen organischen Säuren wurde nicht untersucht und bleibt weiterer Arbeit vorbehalten.

Sämtliche in den folgenden Tabellen angeführten Versuchsdaten gehören in den linearen Verlauf des Stoffwechsels, sie sind auf den Gesamtstickstoffgehalt der Bakterien bezogen.

Mangel- und Normalkulturen wurden stets in Stadien gleichen Gehalts an Bakteriensubstanz (Trockengewicht) stoffwechselphysiologisch untersucht.

Bakterien aus Normalkulturen, die bis zu 1,5 mg Trockensubstanz/ml enthielten, verarbeiteten Malat optimal, mit zunehmendem Alter der Kulturen nahm die Fähigkeit zur Malatverarbeitung ab. Succinat und Fumarat wurden ebenfalls so intensiv wie Malat verarbeitet.

Azetat, Pyruvat und Lactat dagegen wurden nur von sehr jungen Kulturen (Trockensubstanz bis zu 0,7 mg/ml) optimal umgesetzt. Mit dem Alter der Kultur sank die Verarbeitungsaktivität viel schneller als für Malat. Schon bei einer Dichte von 1,6 mg Trockensubstanz/ml betrug sie nur noch 10% des maximalen Wertes.

Infolge der allgemeinen altersbedingten Schädigung des Stoffwechselapparates und des unterschiedlichen Verhaltens gegenüber verschiedenen Säuren konnte die vergleichende Untersuchung der Säureverarbeitung nur an jungen Kulturen mit einem Trockensubstanzgehalt bis zu 0,7 mg/ml vorgenommen werden.

2. Anaerobe Verarbeitung organischer Säuren bei Manganmangel

Unter Manganmangelbedingungen angezogene Bakterien verarbeiteten Malat mit geringerer Geschwindigkeit als Normalbakterien. Manganzufuhr erhöhte in jungen Kulturen die Aktivität auf den Normalwert, in alten war dies nicht mehr möglich, wahrscheinlich als Folge eines altersbedingten Leistungsabfalls.

Die Messung des anaeroben Umsatzes von Succinat und Fumarat ergab dieselben Resultate wie beim Malat. Manganmangel prägte sich etwas stärker aus, aber die volle Leistungsfähigkeit wurde stets durch Zufuhr von Mangan wiederhergestellt (Abb. 23).

Bei der Verarbeitung von Lactat und Pyruvat zeigten Manganmangelkulturen während der „lag-phase" eine geringfügige Aktivitätssenkung, nach 70—90 Minuten wurde aber stets ungefähr die Aktivität von Normalkulturen erreicht. Die Zugabe von Mangan steigerte den Stoffwechsel nicht (Abb. 23).

Azetat wurde durch Normal- und Mangelbakterien gleich intensiv umgesetzt (Abb. 23). Zwar trat auch hier während der „lag-phase" etwas verringerte Aktivität auf, nach 90 Minuten verlief sie aber wie bei einer

Normalkultur. Die Zugabe von Mangan förderte die Azetatverarbeitung nicht, sondern wirkte sogar etwas hemmend.

Die gehemmte Verarbeitung von Malat, Succinat und Fumarat durch die Anzucht unter Manganmangelbedingungen trat auch schon bei einer Verarmung der Zellen an Mangan durch zweimaliges Waschen mit einprozentiger NaCl-Lösung auf. In einer einprozentigen NaCl-Lösung war ihre Stoffwechselaktivität erniedrigt, konnte aber durch Zufuhr von Mangan sofort normalisiert werden. Die Ursache für diese Stoffwechselerniedrigung liegt wahrscheinlich im Auswaschen des Mangans aus den Zellen oder der Zelloberfläche. Die Verarbeitung von Azetat, Lactat und Pyruvat konnte durch eine Verarmung an Mangan nicht beeinträchtigt werden.

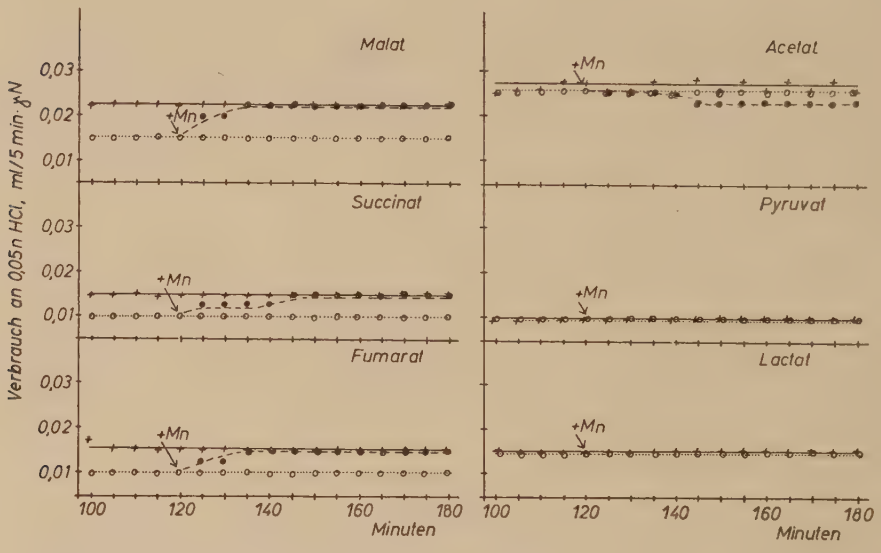


Abb. 23. Anaerobe Verarbeitung organischer Säuren durch Normal- und Manganmangelbakterien von *Rhodopseudomonas*.

+——————+ Normalbakterien
o·····o Manganmangelbakterien
•— — — —• Zugabe von Mangan zu den Manganmangelbakterien

3. Aerobe Verarbeitung organischer Säuren im Dunkeln durch Normal- und Manganmangelbakterien

Die aerobe Verarbeitung organischer Säuren verlief bei allen untersuchten Säuren intensiver als die anaerobe (Abb. 24). Manganmangel wirkte sich in allen Fällen auf den aeroben Stoffwechsel wie beim anaeroben aus.

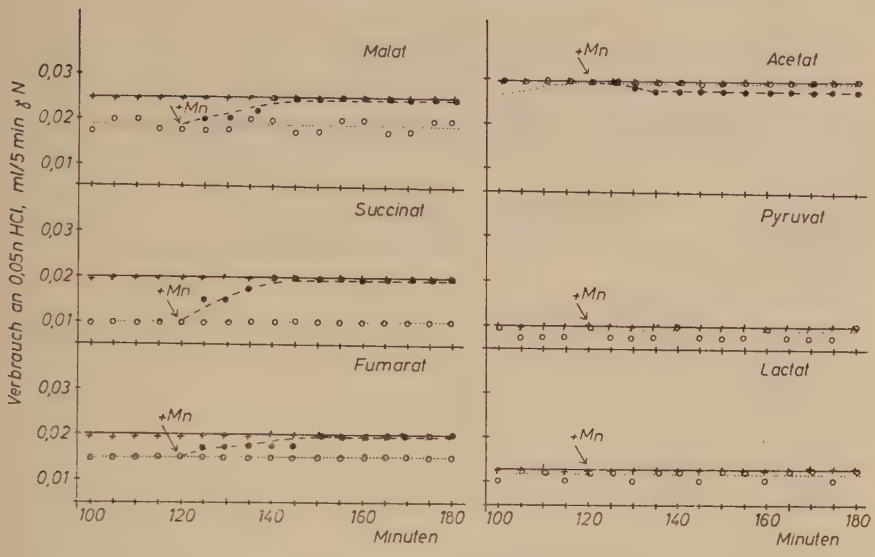


Abb. 24. Aerobe Verarbeitung organischer Säuren durch Normal- und Mangan-mangelbakterien von *Rhodopseudomonas*.

+——+ Normalbakterien
o·····o Manganmangelbakterien
•— — —• Zugabe von Mangan zu den Manganmangelbakterien

4. Anaerobe Verarbeitung organischer Säuren bei Eisenmangel

Auf Grund der festgestellten Abhängigkeit der Verarbeitung einiger organischer Säuren vom Mangan erhielt die Lösung für die Stoffwechselmessung unter den Bedingungen des Eisenmangels stets einen Zusatz von 0,01 Mol KCl/L und 10^{-7} Mol Mn^{++}/L. Eisenmangel während der Anzucht von *Rhodopseudomonas* senkte die anaerobe Verarbeitung von Malat. Schon bei Kulturen mit einem Trockengewicht von 1,0 mg/ml trat diese Verminderung deutlich hervor, mit fortschreitendem Alter sank sie weiter ab.

Die Zufuhr von Eisen förderte bei Eisenmangelbakterien die Stoffwechselleistung. Sie stieg nach der Zugabe des Eisens während 20 Minuten langsam an und blieb dann konstant (Abb. 25). Bei jungen Bakterien wurde die normale Leistung annähernd wiederhergestellt, bei älteren war dies nicht mehr möglich.

Sämtliche untersuchten Säuren zeigten in ihrer Abhängigkeit vom Eisen keine grundsätzlichen, sondern nur quantitative Unterschiede (Abb. 25). Der Eisenmangel prägte sich am stärksten auf die Verarbeitung von Pyruvat, Lactat, weniger bei Azetat, Fumarat, Succinat und Malat aus. Eisen erhöhte in allen Fällen den Stoffwechsel der Mangelbakterien.

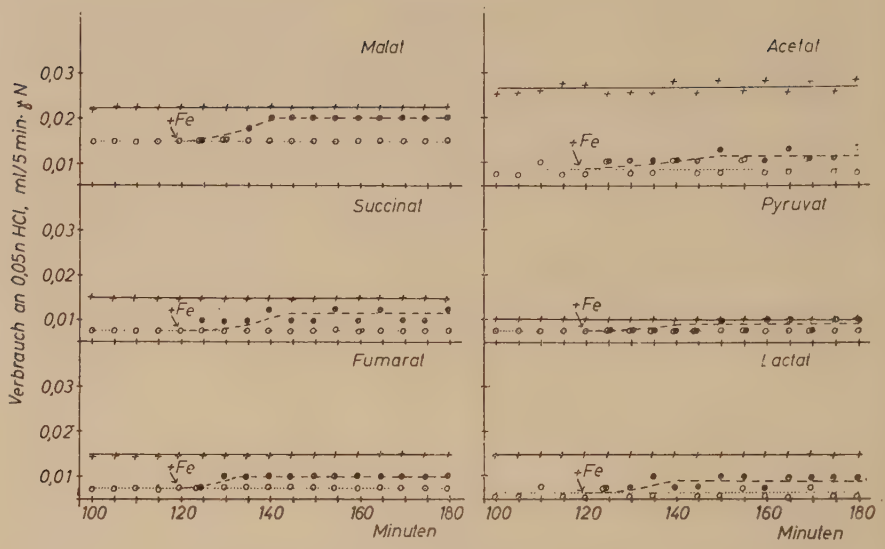


Abb. 25. Anaerobe Verarbeitung organischer Säuren durch Normal- und Eisenmangelbakterien von *Rhodopseudomonas*.

Normalbakterien
Eisenmangelbakterien
Zugabe von Eisen zu den Eisenmangelbakterien

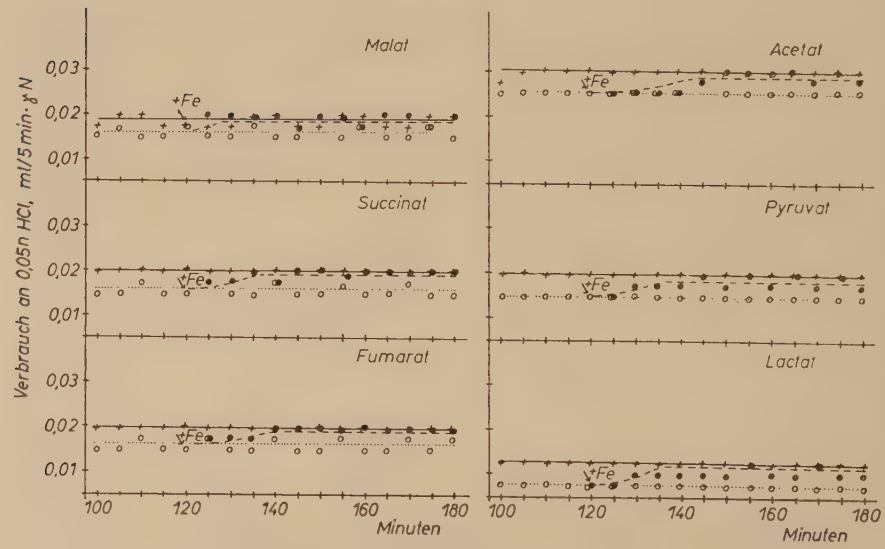


Abb. 26. Aerobe Verarbeitung organischer Säuren durch Normal- und Eisenmangelbakterien von *Rhodopseudomonas*.

Normalbakterien
Eisenmangelbakterien
Zugabe von Eisen zu den Eisenmangelbakterien

5. Aerobe Verarbeitung organischer Säuren im Dunkeln bei Eisenmangel

Die Wirkungen des Eisens auf den aeroben Stoffwechsel waren die gleichen wie bei der anaeroben Säureverarbeitung (Abb. 26).

IV. Besprechung der Ergebnisse

Die Befunde vorliegender Arbeit sind in einer Tabelle als Grundlage für die Diskussion zusammengestellt.

Wirkungen des Mangan- und Eisenmangels bei *Rhodopseudomonas spheroides*

	Manganmangel	Eisenmangel
Wachstum	geringfügig verlangsamt	stark verlangsamt
Anteil der löslichen Stickstoffverbindungen am Gesamtstickstoffgehalt	normal	erhöht
Bakteriochlorophyllgehalt	normal	stark verringert
Gehalt an Gesamt-Karotinoiden	normal	verringert
Anaerobe und aerobe Verarbeitung organischer Säuren		
a) Malat, Succinat, Fumarat	verringert	verringert
b) Pyruvat, Lactat, Azetat	normal	verringert
Kurzfristige Erhöhung des Stoffwechsels von Mangelkulturen nach Zugabe des Mangel-Ions	auf den Wert der Normalkultur	der Wert der Normalkultur wird nicht erreicht
Normalisierung des Wachstums durch Zugabe des Mangel-Ions	langsam	sofort

Die vergleichende biochemische Betrachtung der Mangelsymptome bei *Rhodopseudomonas spheroides* und den von anderer Seite (Pirson 1937, Pirson und Mitarbeiter 1952, Bergmann 1955, Reisner und Thompson 1956, Eyster und Mitarbeiter 1956, 1958, Kessler 1955, 1957) beschriebenen Mangan- und Eisenmangelerscheinungen bei Grünalgen vom *Chlorella*-Typ liefert einige wichtige Gesichtspunkte.

Zunächst ist der erhebliche Konzentrationsunterschied bemerkenswert, der im Manganbedarf der beiden Organismentypen besteht. Während bei *Chlorella vulgaris* die reversible Photosynthesehemmung und die entsprechende Wachstumshemmung durch Manganmangel schon ohne besondere Reinigungsmaßnahmen in den Manganmangellösungen erzielbar sind, liegt der Manganbedarf im Stoffwechsel von *Rhodopseudomonas spheroides* bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen. Dieser Unterschied entspricht in der Größenordnung demjenigen, der bei *Chlorella* für das Wachstum unter autotrophen und heterotrophen Bedingungen besteht. Reisner und Thompson (1956)

sowie EYSTER und Mitarbeiter (1956, 1957) haben hier ein Bedarfsverhältnis zwischen 100 : 1 bis 1000 : 1 ermittelt. Der relativ hohe Manganbedarf für die autotroph ernährten Chlorellen läßt sich zwanglos darauf zurückführen, daß das Mangan seine Hauptwirkung im Zuge der Sauerstoffentwicklung, d. h. auf der oxydativen Seite der Photosynthese, ausübt, wie von KESSLER (1955, 1957) überzeugend nachgewiesen worden ist. Athiorhodaceen zeigen somit in dieser quantitativen Hinsicht Ähnlichkeiten mit Algen, die durch Wasserstoffadaptation auf die anaerobe Photoreduktion umgestellt worden sind.

Der geringe Manganbedarf von *Rhodopseudomonas* ist möglicherweise nicht in gleicher Weise auf einen Einzelprozeß zurückzuführen, sondern kann zwei Vorgänge betreffen: 1. die Reaktionen, welche die Wasserstoffdonatoren in die Photosynthese einführen, 2. die sonstige Verwertung dieser Wasserstoffdonatoren in Stoffwechsel und Wachstumsverlauf. Die sich daraus ergebenden Probleme werden weiter unten näher erläutert (S. 36).

Das für den Manganmangel bei Grünalgen charakteristische Fehlen einer Chlorose (PIRSON und Mitarbeiter 1952, DERSCH 1959, EYSTER 1958) trifft auch für die Athiorhodacee *Rhodopseudomonas spheroides* zu. In beiden Fällen ist die Störung des Photosyntheseapparates völlig unabhängig vom Pigmentsystem, sofern nicht schwere sekundäre Schädigungen eingetreten sind, die im übrigen unter unseren Bedingungen bei *Rhodopseudomonas* kaum erreicht wurden. Dasselbe gilt für den Stickstoffhaushalt, sofern sich dieser durch Bestimmung des Proteinstickstoffs und des TES-löslichen Stickstoffs hinreichend charakterisieren läßt.

In letzterer Hinsicht verhält sich der Eisenmangel grundsätzlich anders. Sowohl in dieser Arbeit ermittelte analytische Daten als auch die Erfahrungen an Grünalgen (PIRSON und Mitarbeiter 1952, BADOUR 1959) sprechen dafür, daß Eisenmangel sehr rasch zu tiefgreifenden Symptomen führt. Trotzdem konnte bei *Rhodopseudomonas* im Stoffwechselversuch (Säureverbrauch) eine kurzfristige partielle Reversibilität nachgewiesen werden, die im Algenstoffwechsel nicht zu beobachten ist. Die Pigmentgarnitur ist bei Grünalgen und *Rhodopseudomonas* gleichermaßen in Mitleidenschaft gezogen. Dabei geht in beiden Fällen die Hemmung der Pigmentbildung der Erhöhung des Verhältnisses TES-löslicher Stickstoff/Proteinstickstoff voran.

Die Verwertung der Wasserstoffdonatoren ist in unseren Versuchen unabhängig von den verwendeten Säuren durch eine Alkalisierung meßbar, die auf Dekarboxylierung beruhen muß. Letztere ist nicht bei allen Säuren in gleichem Maße vom Manganmangel betroffen. Nur die anaerobe und aerobe Verarbeitung von C_4-Dikarbonsäuren (Malat, Succinat, Fumarat)

ist bei Manganmangel gehemmt und wird durch Zugabe des fehlenden Ions normalisiert. Dagegen ist die Verwertung von C_3-Karbonsäuren (Pyruvat, Lactat) und von Azetat bei Manganmangelbakterien nicht verändert und daher auch durch die Zugabe von Mangan nicht zu steigern.

Im Unterschied zu diesen Stoffwechselbefunden war aber das Wachstum unabhängig von den als Substrat dienenden organischen Säuren stets verlangsamt.

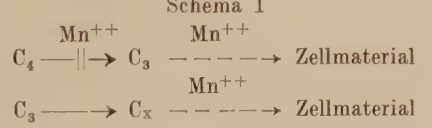
Wollte man vor der Annahme ausgehen, daß die organischen Säuren im Lichtstoffwechsel der Purpurbakterien Kohlendioxyd liefern und daß dieses auf normalem photosynthetischen Weg zu organischem Material verarbeitet wird, dann wäre aus unseren Versuchen abzuleiten, daß die CO_2-Lieferung durch die Säuren nicht der manganabhängige Stoffwechselschritt sein kann. Denn die Zufuhr von Kohlendioxyd beeinflußte die Wachstumshemmung durch Manganmangel in keiner Weise. Die Funktion der organischen Säuren bei der Reduktion eines „Photoperoxyds" oder des Kohlendioxyds bzw. seines primären Reaktionsprodukts (Phosphorglyzerinsäure?) (Kamen 1956) kann aber gleichfalls nicht manganabhängig sein, da dann im Stoffwechselexperiment bei sämtlichen Wasserstoffdonatoren eine Abhängigkeit vom Mangan zu fordern wäre.

Der Einfluß des Mangans muß daher bei Athiorhodaceen innerhalb der Abbaureaktionen an den organischen Säuren vermutet werden.

Zwei Möglichkeiten bieten sich zur Erklärung der Unterschiede der Manganwirkung im Stoffwechsel- und im Wachstumsexperiment an:

1. Die Eingangsreaktion der C_4-Säuren, d. h. ihre Dekarboxylierung, ist manganabhängig, aber ebenso ein weiterer Teilvorgang beim assimilatorischen Aufbau von Zellmaterial. Die primäre Dekarboxylierung von C_3-Säuren und von Essigsäure ist dagegen manganunabhängig. Für die Wachstumsverminderung durch den Manganmangel bei einer Anzucht der Bakterien mit diesen Säuren ist derselbe Schritt wie bei Verwertung der C_4-Säuren verantwortlich. In Schema 1 ist diese Erklärungsmöglichkeit dargestellt, sie nimmt im ersten Fall zwei, im zweiten Fall nur einen (den gemeinsamen) manganabhängigen Schritt an:

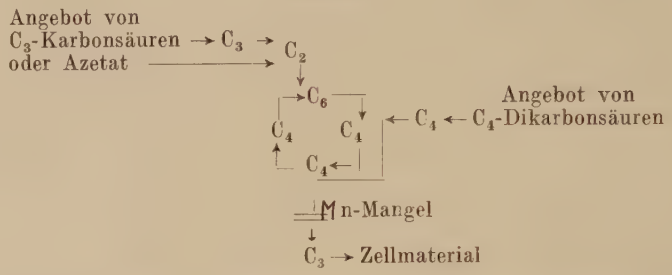
Schema 1



2. Für die Hemmung der Verarbeitung von C_4-Säuren im Stoffwechselexperiment und die Wachstumsverlangsamung ist nur ein einziger manganabhängiger Vorgang verantwortlich. Ist eine C_3-Karbonsäure oder Essig-

säure der Wasserstoffdonator, dann liegt, da deren Verwertung im Stoffwechselexperiment manganunabhängig ist, der manganabhängige Prozeß nach einer Kondensation, die direkt oder auf Umwegen einen C_4-Körper liefert. Der Abbau desselben ist vom Mangan abhängig; auf ihm beruht die Wachstumshemmung bei der Anzucht der Bakterien auf Pyruvat oder Azetat. Dieser Schritt ist derselbe wie beim Abbau der C_4-Dikarbonsäuren (Schema 2).

Schema 2



Es war durch unsere Untersuchungen nicht sicher zu entscheiden, welche der beiden Erklärungen unserer Ergebnisse zutrifft.

Man mag aber der zweiten Deutung den Vorzug geben, da sie nur einen einzigen manganabhängigen Schritt für den Abbau aller geprüften Karbonsäuren vorsieht.

Für die Wirkung des Mangans bei einer Dekarboxylierung von C_4-Säuren sprechen auch die Befunde von VERNON und KAMEN (1953), wonach das „malic-enzyme" in *Rhodospirillum rubrum* vorhanden ist. Ein gleiches oder ähnliches manganabhängiges Enzymsystem zur Dekarboxylierung von C_4-Säuren könnte daher auch bei *Rhodopseudomonas* vorliegen. Mit dem von uns angenommenen Schritt von einer C_4- auf eine C_3-Stufe stimmt die Auffassung von ELSDEN und ORMEROD (1956) überein, die einen Abbauvorgang der als Wasserstoffdonator angebotenen Bernsteinsäure über Fumarsäure und Äpfelsäure bis zur Oxalessigsäure annehmen. Letztere soll zu Phosphoenolbrenztraubensäure dekarboxyliert, phosphoryliert und über eine Redaktion auf die Stufe des Triosephosphats gebracht und zu Zellmaterial weiterverarbeitet werden (EISENBERG 1953, UTTER und KURAHASHI 1954). Dieser Abbauweg würde unter Teilnahme von Fermenten des Zitronensäurezyklus verlaufen, der in den Photobakterien auch für den Abbau von Pyruvat und Azetat herangezogen wird (ELSDEN 1954, ELSDEN und ORMEROD 1956, CLAYTON 1957, KAMEN und Mitarbeiter 1951).

ELSDEN und ORMEROD (1956) schließen aus der Anhäufung von Fluorzitronensäure bei Vergiftung mit Fluoressigsäure auf das Vorhandensein des Zitronensäurezyklus im Säurestoffwechsel der Athiorhodaceen. Die Ergebnisse von CLAYTON (1957)

der Hemmung des anaeroben Abbaus von Azetat und Pyruvat durch Malonsäure lassen die gleiche Schlußfolgerung zu. KAMEN und Mitarbeiter (1951) konnten mit radioaktiv markiertem Azetat in langfristigen Versuchen eine Häufung der Radioaktivität in den Säuren des Zitronensäurezyklus feststellen. Allerdings waren die Radiogramme kurzfristiger Versuche von GLOVER und Mitarbeitern (1952) vor allem im Bereich der Bernsteinsäure und der Ketoglutarsäure und erst nach längerer Versuchsdauer auch bei den anderen Säuren des Zitronensäurezyklus markiert.

Diese Heranziehung des Zitronensäurezyklus oder eines ähnlichen Abbauweges für den anaeroben Säureabbau kann einmal die Unabhängigkeit der primären Dekarboxylierung der C_3-Karbonsäuren im Stoffwechselversuch erklären, zum anderen steht sie auch im Einklang mit unseren völlig identischen Befunden beim Vergleich der Manganwirkung auf die anaerobe und aerobe Säureverarbeitung. Für letztere wird auch die Beteiligung des Zitronensäurezyklus angenommen.

Auf Grund der Existenz des Zitronensäurezyklus kann daher für Lactat, Pyruvat und Azetat folgender Abbauweg angenommen werden:

Azetat wird durch ein aktivierendes Enzymsystem, das EISENBERG (1955, 1957) in *Rhodospirillum rubrum* nachweisen konnte, über Azetyl-Co-Enzym A durch Kondensation mit Oxalessigsäure verbunden. Damit tritt es in den Zitronensäurezyklus ein. Die folgende (erste) Dekarboxylierung ist manganunabhängig. Auf der Stufe der C_4-Säuren verläßt es zum Aufbau von Zellmaterial den Zitronensäurezyklus. Dies ist der manganabhängige Stoffwechselschritt, der bei Manganmangel zur Hemmung der Substanzproduktion führt. Er ist identisch mit dem für die Manganhemmung verantwortlichen Dekarboxylierungsvorgang bei C_4-Säuren als Wasserstoffdonatoren. In ähnlicher Weise verläuft der Abbau von Pyruvat und Lactat, bei denen die manganunabhängige Dekarboxylierung vor der Aktivierung zu Acetyl-Co-Enzym A liegen kann. Angaben von MORITA (1955) stützen diese Annahme. Er fand bei *Rhodopseudomonas palustris* Anhaltspunkte für einen Abbau der Milchsäure im Licht und im Dunkeln über Brenztraubensäure und eine nachfolgende Dekarboxylierung.

Es bleibt in dieser Arbeit ungeklärt, ob neben dem besprochenen manganabhängigen Schritt beim Abbau der organischen Säuren durch den Zitronensäurezyklus oder einen ähnlichen Abbaumechanismus noch weitere Abbauschritte manganabhängig sind, z. B. das „condensing enzyme" (STERN und Mitarbeiter 1950), die Brenztraubensäure-Oxydase (KORKES und Mitarbeiter 1950) oder die Äpfelsäure-Dehydrogenase (VENNESLAND und Mitarbeiter 1949). Für die Athiorhodaceen wurde die Manganabhängigkeit dieser Reaktionen im Stoffwechsel in vivo bisher nicht nachgewiesen. Unsere Versuchsbedingungen schließen die Möglichkeit nicht aus, daß die allerunterste Grenze des Manganbedarfs noch nicht erreicht wurde.

Als maßgebend für die Verminderung des Wachstums bei Mangan-mangel wurde bisher die Verringerung des Abbaus der organischen Säuren diskutiert. Im Gegensatz zur sofortigen Aufhebung der Stoffwechselaktivitätshemmung durch die Zugabe von Mangan setzte sich aber die Normalisierung des Wachstums bei *Rhodopseudomonas* nur langsam durch (vgl. S. 17, Abb. 1). Diese Verzögerung beruht vielleicht darauf, daß die Säureverarbeitung erst normalisiert und ein günstiges Verhältnis zwischen dem neu gebildeten Kohlenhydrat und dem Stickstoffgehalt der Zellen erzielt wird, bevor normale Wachstumsraten eintreten.

Es liegt nahe, den bei Eisenmangel verminderten Lichtstoffwechsel von *Rhodopseudomonas* vor allem auf die verminderte Pigmentgarnitur zurückzuführen. Die in unseren Versuchen erzielte partielle Reversibilität des Stoffwechsels spricht aber gegen die Annahme einer vorwiegenden Beeinträchtigung des Lichtstoffwechsels durch den verringerten Bakteriochlorophyllgehalt.

Die Parallelität der Hemmung des anaeroben und des aeroben Stoffwechsels durch Eisenmangel, unabhängig von der Kohlenstoffzahl der Wasserstoffdonatoren, kann vielleicht mit der Wirkung des Eisens auf Cytochrome und ähnliche Verbindungen erklärt werden. Die Beteiligung derselben auch im anaeroben Stoffwechsel der Athiorhodaceen ist kaum in Frage zu stellen, zumal sogar ihre Lokalisierung in den „Chromatophoren" zusammen mit den Photosynthesepigmenten nachgewiesen ist (KAMEN 1955). VERNON und KAMEN (1953), ebenso CHANCE und Mitarbeiter (1953), CHANCE (1957) und DUYSENS (1954, 1957) konnten in *Rhodospirillum rubrum* eine bei Belichtung in Anaerobiose einsetzende Oxydation von Cytochromen unmittelbar nachweisen. Die Wirkung des Eisens könnte sich auf die Synthese der Porphyrine oder der Eiweißkomponente der Cytochrome erstrecken; anderseits auch könnte Eisen direkt als wertigkeitswechselndes Komplexion in die Porphyrine eintreten. Auf Grund unserer Untersuchungen ist die tatsächliche Lage des Angriffspunktes nicht zu entscheiden. Die partielle Reversibilität der Stoffwechselhemmung liegt vielleicht im sofortigen Einbau des Ions in Häminvorstufen.

V. Zusammenfassung

1. Bei *Rhodopseudomonas spheroides* wurden Wachstum, anaerober und aerober Säureverbrauch, Bakteriochlorophyll- und Karotingehalt sowie der Stickstoffgehalt unter den Bedingungen des Mangan- und Eisenmangels untersucht.

2. Die Einzelbefunde für *Rhodopseudomonas spheroides* sind in einer Tabelle zusammengestellt worden (S. 33).

3. Der Manganbedarf von *Rhodopseudomonas spheroides* wurde mit demjenigen von Grünalgen verglichen. Er beträgt $^1/_{100}$ bis $^1/_{1000}$ des Bedarfs von *Chlorella vulgaris*. Der Manganmangel wirkt sich bei *Rhodopseudomonas spheroides* deutlich verschieden vom Eisenmangel aus. Außerdem liegen klare Unterschiede zwischen *Rhodopseudomonas* und *Chlorella* in der quantitativen Wirkung der beiden Spurenelemente vor.

4. Manganmangel wirkt bei *Rhodopseudomonas spheroides* allgemein senkend auf die Wachstumsgeschwindigkeit. Dagegen wird im Experiment nur die anaerobe und aerobe Verarbeitung von C_4-Dikarbonsäuren verringert; die Verwertung von C_3-Karbonsäuren und Azetat ist nicht beeinträchtigt.

Bei etwas gesteigertem Bedarf entspricht die Wirkung des Mangans auf die Verwertung der Wasserstoffdonatoren im aeroben Stoffwechsel vollkommen derjenigen im anaeroben.

Eiweißhaushalt und Pigmentspiegel werden durch Manganmangel primär nicht verändert.

5. Eisenmangel ruft bei *Rhodopseudomonas spheroides* viel tiefgreifendere Veränderungen hervor als Manganmangel. Wachstum, anaerober und aerober Säureverbrauch, Proteinstickstoff und Pigmente sind vermindert.

6. In der Diskussion wird versucht, die verschiedenen Äußerungen des Mangan- und Eisenmangels zu erklären. Die Abhängigkeit der Verarbeitung der Wasserstoffdonatoren vom Manganmangel nach Maßgabe ihrer C-Zahl und die allgemeine Wachstumshemmung durch Manganmangel werden auf Grund der bisher vorliegenden Kenntnisse vom C-Stoffwechsel der Photobakterien gedeutet.

Summary

1. Growth of *Rhodopseudomonas spheroides* as well as the anaerobic and aerobic utilisation of different carboxylic acids, together with the contents of the bacteria of chlorophyll, carotinoids, nitrogen were determined under conditions of manganese and iron deficiencies.

2. The results have been summarized in the table, given in page 33.

3. Manganese needed for *Rhodopseudomonas spheroides* has been found to correspond to about $^1/_{100}$—$^1/_{1000}$ of the concentration required by *Chlorella vulgaris*. The response of *Rhodopseudomonas spheroides* to manganese deficiency proved to be completely different from that to iron deficiency.

4. The growth of *Rhodopseudomonas spheroides* was always retarded by manganese deficiency under different supply of carboxylic acids. On the other hand, the anaerobic and aerobic utilisation of malic, succinic and

fumaric acid were suppressed in metabolic experiments, whereas the use of pyruvic, lactic and acetic acid was not influenced through manganese deficiency. Protein and pigment content of manganese deficient *Rhodopseudomonas spheroides* remained unchanged compared with normally grown bacteria.

5. Iron deficiency in *Rhodopseudomonas spheroides* caused more severe symptoms than did manganese deficiency. Growth, the rate of anaerobic and aerobic utilisation of the carboxylic acids investigated as well as protein and pigments were obviously reduced.

6. The results have been discussed in relation to the present knowledge concerning the metabolism of the Athiorhodaceae.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. A. PIRSON, bin ich für die Überlassung des Themas sowie für die ständige Förderung meiner Arbeit zu großem Dank verpflichtet. Ebenfalls danke ich Herrn Dr. S. R. ELSDEN für die Möglichkeit eines halbjährigen Studienaufenthaltes am Mikrobiologischen Institut der Universität Sheffield (England).

Die vorliegende Untersuchung wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, wofür an dieser Stelle gedankt sei.

Literatur

ARNON, D. J., 1959. Conversion of light into chemical energy in photosynthesis. Nature **184**, 10—21. — BADOUR, S., 1959. Analytisch-chemische Untersuchung des Kaliummangels bei *Chlorella* im Vergleich mit anderen Mangelzuständen. Diss. Göttingen. — BERGMANN, L., 1955. Stoffwechsel und Mineralsalzernährung einzelliger Grünalgen. II. Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß mineralischer Faktoren bei heterotropher und mixotropher Ernährung. Flora **142**, 493—539. — CHANCE, B., 1957. On the time sequence of reactions in the anaerobic light effect in *Rhodospirillum rubrum*. In: Research in Photosynthesis, 184—192. New York, Intersc. Publ., Inc. — Ders., SMITH, L., and CASTOR, L., 1953. New methods for the study of the carbon monoxide compounds of respiratory enzymes, Biochim. et Biophys. Acta **12**, 289—298. — CLAYTON, R. K., 1955. Competition between light and dark metabolism in *Rhodospirillum rubrum*. Arch. Mikrobiol. **22**, 195—203. — Ders., 1956. Photosynthetic metabolism of propionate in *Rhodospirillum rubrum*. Arch. Mikrobiol. **26**, 29—31. — COHEN-BAZIRE, G., SISTROM, W. R., and STANIER, R. Y., 1957. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. J. Cell Comp. Physiol. **49**, 25—68. — DERSCH, G., 1959. Die Sekundärkarotinoide einzelliger Grünalgen. Diss. Marburg. — DUYSENS, L. N. M., 1954. Reversible photo-oxidation of a cytochrome pigment in photosynthesising *Rhodospirillum rubrum*. Nature **173**, 692—693. — Ders., 1957. Investigations in the photosynthetic mechanism of purple bacteria by means of sensitive absorption spectrophotometry. In: Research in Photosynthesis, 164—173. New York, Intersc. Publ., Inc. — EISENBERG, M. A., 1953. The tricarboxylic acid cycle in *Rhodospirillum rubrum*. J. biol. Chem. **203**, 815—836. — Ders., 1955. The acetate-activating enzyme of *Rhodospirillum rubrum*. Biochim. et biophys. Acta **16**, 58—65. — Ders., 1957. The acetate-activating mechanism in *Rhodospirillum rubrum*. Biochim. et biophys. Acta **23**, 327—332. — ELSDEN, S. R., 1954. The utilization of

organic compounds by photosynthetic bacteria. In: Autographic Micro-organisms, 203—223. Cambridge. — Ders., and Ormerod, J. G., 1956. The effect of monofluoroacetate on the metabolism of *Rhodospirillum rubrum*. Biochem. J. **63**, 691—701. — Eyster, C., Thomas, C., Brown, E., and Tanner, H. A., 1956. Manganese requirement with respect to respiration and Hill reaction in *Chlorella pyrenoidosa*. Arch. Biochem. and Biophys. **64**, 240—241. — Ders., Brown, T. E., Tanner, H. A., and Hood, S. L., 1958. Manganese requirement with respect to growth, Hill reaction and photosynthesis. Plant Physiol. **33**, 235—241. — Gerretsen, F. C., 1949. Manganese in relation to photosynthesis I. Plant and Soil **1**, 346—358. — Ders., 1950. Manganese in relation to photosynthesis II. Plant and Soil **2**, 159—193. — Goodwin, T. W., 1952. The comparative biochemistry of the carotenoids. London, Chapman and Hall Ltd. — Ders., Land, D. G., and Osmann, H. G., 1955. Studies in carotenogenesis. 14. Carotenoid synthesis in the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas spheroides*. Biochem. J. **59**, 491—496. — Glover, J., Kamen, M. D., and Genderen, H. van, 1952. Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria. XII. Comparative light and dark metabolism of acetate and carbonate by *Rhodospirillum rubrum*. Arch. Biochem. **35**, 384—408. — Hendley, D. D., 1955. Endogenous fermentation in Thiorhodaceae. J. Bact. **70**, 625—634. — Hewitt, E. J., 1951. The role of the mineral elements in plant nutrition. Ann. Rev. Plant. Physiol. **2**, 25—52. — Kamen, M. D., 1955. Bacterial heme proteins. Bact. Rev. **19**, 250—262. — Ders., 1956. Hematin compounds in the metabolism of photosynthetic tissues. In: Enzymes: Units of Biological Structure and Function. Henry Ford Hospital Internat. Symposium, 483—498. New York, Academic Press, Inc. — Ders., 1957. Hematin compounds in the metabolism of photosynthetic tissues. In: Research in Photosynthesis, 149—163. New York, Intersc. Publ., Inc. — Ders., Ajl, S. J., Ranson, S. L., and Siegel, J. M., 1951. Nonequivalence of methyl and carboxyl groups in photosynthetic metabolism of acetate in *Rhodospirillum rubrum*. Science **113**, 302.— Ders., and Vernon, L. P., 1954. Enzymatic activities affecting cytochromes in photosynthetic bacteria. J. biol. Chem. **211**, 663 — 675.—Kessler, E., 1955. On the role of manganese in the oxygen-evolving system of photosynthesis. Arch. Biochem. and Biophys. **59**, 527—529. — Ders., 1957. Stoffwechselphysiologische Untersuchungen an Hydrogenase enthaltenden Grünalgen. I. Über die Rolle des Mangans bei Photoreduktion und Photosynthese. Planta **49**, 435—454. — Korkes, S., Stern, J. R., Gunsalus, J. C., and Ochoa, S., 1950. Enzymatic synthesis of citrate from pyruvate and oxaloacetate. Nature **166**, 439—440. — Lascelles, J., 1955. The formation of porphyrins by photosynthetic bacteria. Ciba Foundation Symposium on Porphyrin Biosynthesis and Metabolism, 265—282. — Ders., 1955. The synthesis of porphyrins and bacteriochlorophyll by cell suspensions of *Rhodopseudomonas spheroides*. Biochem. J. **62**, 78—93. — Löhnis, M. P., 1951. Manganese toxicity in field and marked garden crops. Plant and Soil **3**, 193—222. — Lorenzen, H., 1957. Synchrone Zellteilung von *Chlorella* bei verschiedenen Licht-Dunkel-Wechseln. Flora **144**, 473—495. — Ders., 1959. Die photosynthetische Sauerstoffproduktion wachsender *Chlorella* bei langfristiger intermittierender Belichtung. Flora **147**, 382—404. — Morita, S., 1955. The effect of light on the metabolism of lactic acid by *Rhodopseudomonas palustris*. I. J. Biochem. **42**, 533—554. — Pirson, A., 1937. Ernährungs- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an *Fontinalis* und *Chlorella*. Zschr. Bot. **31**, 193—267. — Ders., 1958. Manganese and its role in photosynthesis. In: Trace Elements, 81—98. New York, Academic Press, Inc. — Ders., 1958. Mineralstoffwechsel und Photosynthese. In: Handbuch der Pflanzenphysiologie IV, 355—381. Berlin

Springer Verlag. — Ders., Tichy, C., u. Wilhelmi, G., 1952. Stoffwechsel und Mineralsalzernährung einzelliger Grünalgen. I. Vergleichende Untersuchungen an Mangelkulturen von Ankistrodesmus. Planta **40**, 199—253. — Reisner, G. S., and Thompson, J. F., 1956. Manganese deficiency in *Chlorella* under heterotrophic carbon nutrition. Nature **178**, 1473—1474. — Smith, H. C., and Benitez, A., 1955. Chlorophylls: Analysis in plant materials. In: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse IV, 142—196. Berlin, Springer Verlag. — Stanier, R. Y., 1959. Formation and Function of the photosynthetic pigment system in purple bacteria. In: The Photochemical Apparatus its Structure and Function, Brookhaven Symposium in Biology, **11**, 43—53. — Stern, J. R., Shapiro, B., and Ochoa, S., 1950. Synthesis and breakdown of citric acid with crystalline condensing enzyme. Nature **166**, 403—404. — Utter, M. F., and Kurahashi, K., 1954. Mechanism of action of oxalacetic corboxylase. J. biol. Chem. **207**, 821—841. — Van Niel, C. B., 1941. The bacterial photosynthesis and their importance for the general problem of photosynthesis. In: Advances in Enzymology **1**, 263—328. New York, Intersc. Publ., Inc. — Ders., 1947. Studies on the pigments of the purple bacteria. III. The yellow and the red pigments of *Rhodopseudomonas spheroides*. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. a. Serol. **12**, 156—166. — Vennesland, B., Gollup, M. C., and Speck, J. F., 1949. The carboxylases of plants. I. Some properties oxalacetic carboxylase and its quantitative assay. J. Biol. Chem. **178**, 301—314. — Vernon, L. P., and Kamen, M. D., 1953. Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria. XV. Photoautoxidation of ferrocytochrome in extracts of *Rhodospirillum rubrum*. Arch. Biochem. **44**, 298—311. — Zirpel, W., 1941. Über den Eisenbedarf von *Rhodobacillus palustris* und dessen Beziehung zu Bacteriochlorophyll- und Karotinoidbildung. Zschr. Bot. **36**, 538—561.

Anschrift des Verfassers: Dr. Wolfgang Wiessner, Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen, Untere Karspüle 2.

Lebenslauf

Ich wurde am 2. Februar 1933 als Sohn des Studienrats Dr. Hermann Wiessner in Stettin geboren. Nach dem Besuch der Volksschule kam ich in die Sexta der Bismarck-Oberrealschule. Durch Kriegseinwirkungen verloren meine Eltern ihre Wohnung in Stettin, und wir siedelten 1943 nach Pasewalk über, wo ich die Oberrealschule weiter besuchte. Im Frühjahr 1945 verließen meine Eltern Pasewalk und zogen nach Bad Wilsnack bei Wittenberge. An der dortigen Oberschule legte ich am 23. Juli 1950 die Reifeprüfung ab.

Noch im Herbst desselben Jahres begann ich das Studium der Biologie, Chemie und Geographie an der Landeshochschule in Potsdam. Mein 2. Studiensemester belegte ich an der Martin-Luther-Universität in Halle a. d. Saale.

Im Herbst 1951 unterbrach ich mein Studium und konnte es erst zum Sommersemester 1952 an der Philipps-Universität in Marburg a. d. Lahn wieder aufnehmen.

Anfangs finanzierte ich mein Studium als Werkstudent. Zum Sommersemester 1954 wurde ich auf Vorschlag der Professoren Pirson, Luther und Kessel in die Studienstiftung des deutschen Volkes aufgenommen.

In Potsdam und Halle waren meine akademischen Lehrer die Professoren Müller-Stoll, Lehmann, Buder und Funk, in Marburg und Göttingen in Botanik die Professoren Pirson, v. Stosch, Steffen, Bogen, in Chemie die Professoren Mahr, Dimroth, Meerwein, Pfeil und Glemser, in Mikrobiologie Professor Schlegel und Dozent Dr. Kessler.

Im Wintersemester 1957/58 studierte ich, insbesondere Mikrobiologie, an der Universität in Sheffield (England) bei Dr. Elsden, Dr. Fry und Dr. Gibson.

Zum Sommersemester 1958 kehrte ich wieder nach Marburg zurück und bin seit dem Wintersemester 1958/59 an der Universität in Göttingen immatrikuliert, wo ich unter Professor Pirson meine Dissertation über „Wachstum und Stoffwechsel von *Rhodopseudomonas spheroides* in Abhängigkeit von der Versorgung mit Mangan und Eisen“ im Herbst 1959 abgeschlossen habe.